

Série A, N° 3139

N° d'ordre : 4011

T H E S E S

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Roger NORDMANN

- - - - -

1 ère THESE : "Etudes physiologiques sur le métabolisme des
acides dicarboxyliques du cycle citrique chez le rat."

2 ème THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 mars 1958 devant la Commission d'examen :

M. LAUGIER Président

Mlle. LE BRETON
Examineurs

M. MOYSE

1958
—

Série A, N° 3139

N° d'ordre : 4011

T H E S E S

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Roger NORDMANN

- - - - -

1 ère THESE : "Etudes physiologiques sur le métabolisme des
acides dicarboxyliques du cycle citrique chez le rat."

2 ème THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 mars 1958 devant la Commission d'examen :

M. LAUGIER Président

Mlle. LE BRETON
Examineurs

M. MOYSE





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556007_0028

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

DOYEN J. PERES

G. JULIA	T Analyse sup. et Alg. supérieure
FOCH	T Méc. physique et expérimentale
PAUTHENIER	T Electrotechnique Gle.
DE BROGLIE	T Théories physiques
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées
GARNIER	T Géométrie supérieure
PERES	T Mécan. des fluides et applications
LAUGIER	T Physiologie générale
M. CURIE	T Physique (SPCN)
BARRABE	T Géol. struct. et Géol. appliquée
G. DARMOIS	T Calcul des probabil. et Physique Math.
J. BOURCART	T Géog. phys. et Géol. dynamique
PLANTEFOL	T Botanique
GRASSE	T Evol. des êtres organ.
PREVOST	T Chimie organique
BOULIGAND	T Applic. de l'analyse à la Géométrie
CHAUDRON	T Chimie appliquée
WYART	T Minéralogie
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie végétale
P. AUGER	T Physique quantique et Relativité
MONNIER	T Physiol. des fonctions
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique (SPCN)
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T Chimie Générale
FAVARD	T Mécanique Générale
COULOMB	T Physique du Globe
Mle COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRETIEN	T Chimie minérale
P. DRACH	T Zoologie
KASTKER	T Physique
EPHRUSSI	T Génétique
WURMSER	T Biol. physico-chimique
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.)
GAUTHERET	T Biol. Végétale (P.C.B.)
LUCAS	T Recherches physiques
A. THOMAS	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée

M. MORAND	T Enseignement de Phys.
SOLEILLET	T Physique
FORTIER	T Mécanique expér. des fluides
DANJON	T Astronomie
LAPORTE	T Phys.générale et Radioactivité
JANET	T Mécan.anal. et Mécanique céleste
PETIT	T Biol.maritime
QUENEY	T Météorologie et dyn.atmosphérique
GALLIEN	T Embryologie
EICHHORN	T Biol.Vég. (P.C.B.)
DE CUGNAC	Biol.Vég.(P.C.B.)
Mle CAUCHOIS	T Chimie physique
THELLIER	T Physique du Globe
L'HERITIER	T Génétique
GRIVET	T Radioélectricité
PONCIN	T Mécan.des fluides
DUBREIL	T Arithm.et théorie des nombres
QUELET	T Chimie organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T Géol.struct. et Géol.appliquée
JUNG	T Pétrographie
TRILLAT	T Microscopie et diffr.électronique
WIEMANN	T Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T Spectroscopie et Phys.céleste
VASSY	T Phys.de l'atmosphère
DESTOUCHES	Théories physiques
M. PRUVOST	T Géologie
AMIEL	T Chimie générale (P.C.B.)
HOCART	T Minéralogie
J.P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.)
COUTEAUX	T Biol.animale (P.C.B.)
MAY	T Biol.animale (P.C.B.)
CHOQUET	T Calc.différentiel et Intégral
FELDMANN	T Biologie (P.C.B.)
GUINIER	T Physique générale (P.C.B.)
JOST	T Physiologie comparée
FORTET	T Calc.des probabilités
SCHWARTZ	T Méth.Math. de la physique
CHOUARD	T Physiologie Végétale
MALAVARD	T Aviation
BRELOT	T Calcul différentiel
NORMANT	T Chimie (P.C.B.)
BENARD	T Chimie organique (P.C.B.)
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T Statistique méthém.

GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)
SOULAIRAC	T Psychophysiologie
ULRICH	T Physiol.Végétale
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T Théories chimiques
CHADEFAUD	Botanique
DESTRIAU	T Physique (M.P.C.)
Mlle LE BRETON	T Physiologie générale
SALEM	T Mathém.générales
LELONG	T Mathém.générales
DEVILLERS	Anatomie et Histologie
EHRESMANN	T Topologie Algébrique
FRANCON	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T Géogr.physique et Géol.dynamique
GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T Calcul des Probabilités
ROCH (E.)	T Géologie
SCHATZMANN	Astrophysique
TERMIER	T Paléontologie stratigr.
ZAMANSKY	T Mathém.générales
JOLIOT	T Physique nucléaire et Radioactivité
LENNUIER	Physique (P.C.B.)
RIZET	Génétique
Mme TONNELAT	Théories physiques
DIXMIER	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	Chimie générale
AIGRAIN	Physique (P.C.B.)
BRUSSET	Chimie minérale
M.LEVY	Physique théorique
LENORMANT	Physiologie
Mme CHAIX	Chimie biologique
Mme HUREL-PY	Biol.Végétale (P.C.B.)
PIAUX	Chimie (P.C.B.)
BRUN	Méc.expér.des fluides
LEDERER	T Chimie biologique
Mme DUBREIL	T Mathématiques
Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)
Bellair	Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T Physique (M.P.C.)
DUBOIS J.E.	T Chimie (S.P.C.N.)
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL	T Chimie (S.P.C.N.)
OLMER	T Energétique générale
ROUAULT	T Physique (Enseignement)
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.

SECRETAIRE GENERAL C.MONIER

Dans une revue récente, Krebs (1957) écrivait que " les recherches sur le métabolisme entreprises au cours des trente dernières années concernent essentiellement la mise en évidence des étapes intermédiaires et les propriétés des enzymes qui y participent.... On connaît ainsi actuellement les principales voies du métabolisme intermédiaire. L'intérêt se porte à présent vers d'autres problèmes, en particulier vers l'étude de la régulation des transformations métaboliques"

Si l'on considère, en effet, les données acquises essentiellement à la suite d'expériences réalisées in vitro, on constate que plusieurs voies de dégradation se présentent souvent à un même substrat, de sorte que la question se pose de savoir laquelle de ces voies est suivie de préférence aux autres.

Après l'étude analytique des diverses voies possibles, il apparaît donc important de rechercher lesquels de ces processus se déroulent effectivement dans des conditions déterminées.

Les travaux portant sur l'animal entier ont

de ce point de vue une importance de premier plan, puisque des facteurs physiologiques essentiels, tels que perméabilité cellulaire ou actions nerveuses et hormonales sont artificiellement supprimés ou altérés au cours des expériences réalisées in vitro. Il n'est donc pas surprenant de constater que des conclusions tirées d'expériences effectuées dans ces conditions ne se soient souvent pas confirmées in vivo.

On peut trouver dans la littérature bien des exemples de telles divergences. C'est ainsi que l'oxaloacétate, qui diminue in vitro la cétogénèse hépatique (Koranyi et Szent-Györgyi, 1937), est sans influence sur l'acidocétose du rat (Deuel et coll. 1937) ou des diabétiques humains (Lawrence, 1937).

De même, Potter (1951) constate plus récemment que l'injection de fluorocétate à des rats mâles ne détermine pas d'accumulation intrahépatique de citrate, contrairement aux résultats obtenus sur des coupes ou homogénats hépatiques. Potter en conclut que le déroulement du cycle tricarboxylique est modifié in vivo par le jeu d'hormones et d'autres facteurs non définis.

lisme hépatique de l'acétate, insistent également sur les différences entre les résultats obtenus sur des coupes d'organes et sur l'animal entier et concluent que "le métabolisme hépatique de l'acétate ne présente chez l'animal entier que peu de ressemblances avec son métabolisme dans le foie isolé", les différences observées étant à la fois quantitatives et qualitatives.

Parmi les processus biochimiques fondamentaux, le cycle tricarboxylique (fig.1) a une importance capitale en tant que plaque tournante du métabolisme intermédiaire et fournisseur de l'énergie ainsi que de matériaux nécessaires à de nombreuses synthèses.

Sa connaissance résulte essentiellement de travaux effectués soit sur des systèmes enzymatiques isolés, soit sur des organites cellulaires (en particulier mitochondries et microsomes), soit encore sur des homogénats ou tranches d'organes. Les études portant sur l'animal entier sont, par contre, beaucoup plus rares et plus fragmentaires.

Elles tirent leur importance du fait qu'un grand nombre de voies métaboliques autres que celles du cycle tricarboxylique se présentent à plusieurs des acides de ce cycle.

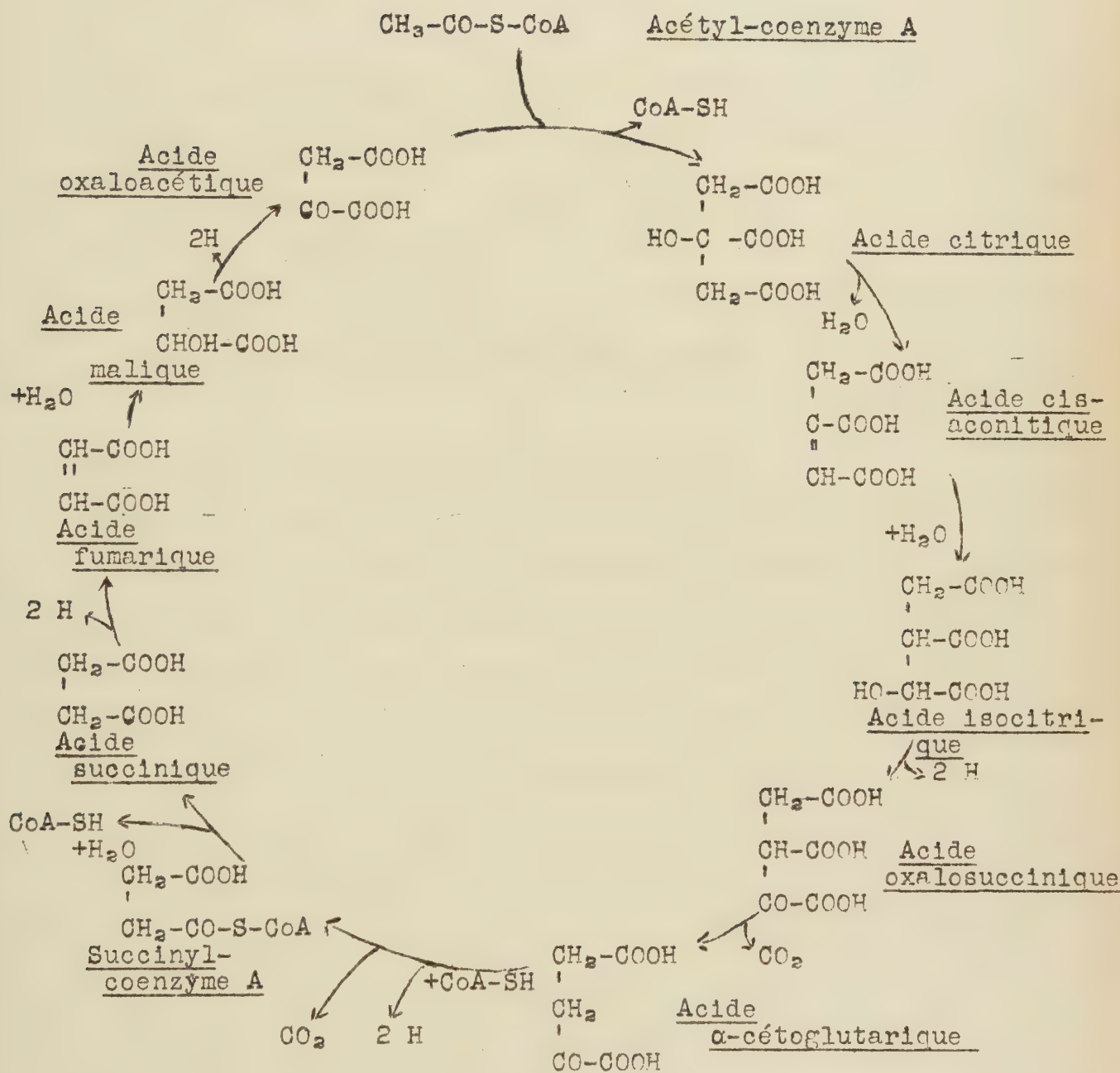


Fig. 1

SCHEMA DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE.

Nous nous sommes attachés au cours de ce travail à préciser le métabolisme des acides dicarboxyliques du cycle citrique chez le rat entier.

Le problème majeur consistait à rechercher si ce métabolisme se déroule exclusivement par l'intermédiaire de ce cycle ou s'il emprunte, au contraire, certaines des voies "alternatives".

Le carrefour le plus important qui se présente aux acides dicarboxyliques se situe au niveau de l'oxaloacétate. C'est à ce niveau qu'intervient un des mécanismes de "régulation" essentiels du métabolisme, puisque l'on connaît au moins cinq destins possibles de l'oxaloacétate (Krebs, 1957) :

- (1) Oxaloacétate + Acétyl-coenzyme A $\rightleftharpoons$ Citrate + Coenzyme A
(enzyme condensant)
- (2) Oxaloacétate + Glutamate $\rightleftharpoons$ Aspartate + α -cétoglutarate
(transaminase glutamique - oxaloacétique)
- (3) Oxaloacétate + DPN réduit $\rightleftharpoons$ Malate + DPN oxydé
(déshydrogénase malique)
- (4) Oxaloacétate + H₂O $\rightarrow$ Pyruvate + Bicarbonate
(décarboxylase oxaloacétique)
- (5) Oxaloacétate + ATP (ou ITP) $\rightleftharpoons$ Phosphoénolpyruvate +
ADP (ou IDP) (réaction de Utter-Kurahashi).

La condensation entre oxaloacétate et acétyl-coenzyme A représente la "réaction-clé" du cycle tri-carboxylique, car elle permet à l'acétyl-coenzyme A résultant de la glycolyse ou du catabolisme des acides gras d'être complètement dégradé en CO_2 et H_2O par l'intermédiaire de ce cycle, alors qu'un manque en oxaloacétate conditionne, au contraire, la transformation de l'acétyl-coenzyme A en acétoacétate, c'est-à-dire la cétogénèse. Inversement, un manque en acétyl-coenzyme A diminue la transformation de l'oxaloacétate en citrate au profit des autres voies métaboliques qui se présentent à l'oxaloacétate.

Nous avons ainsi cherché à différencier in vivo la fraction de l'oxaloacétate qui se condense avec l'acétyl-coenzyme A en citrate de celle qui emprunte une des autres possibilités métaboliques, notamment celle de la transamination.

Un autre problème auquel nous nous sommes attachés est celui du siège du métabolisme de ces acides dicarboxyliques chez l'animal entier. Les travaux cherchant à établir dans quels organes ce métabolisme se déroule avaient, en effet, donné des résultats contradictoires.

En raison de la richesse du foie en enzymes

Intervenant au cours du cycle citrique, il est logique de penser que ce métabolisme est essentiellement intrahépatique. Les études de certains auteurs, tels que Sjöström (1937) semblaient confirmer ce point de vue. A l'opposé, cependant, des auteurs tels que Orten et Smith (1939), Forssman (1941) avaient abouti à des conclusions qui, bien que parcellaires, s'inscrivaient en faveur du rôle prépondérant du rein, et non du foie.

Pour le but que nous nous proposons, il eût été tentant d'injecter des acides marqués au carbone et de suivre le devenir de la radioactivité chez l'animal d'expérience. Nous n'avons cependant pas eu recours aux radioisotopes en raison de deux circonstances défavorables.

La première est que nous projetons d'étendre cette étude à l'homme, auquel il n'est pas sûrement anodin d'administrer du carbone isotopique. La seconde est le coût élevé des études réalisées in vivo avec ces isotopes, dans des conditions nécessitant des quantités de substances marquées beaucoup plus importantes que celles utilisées au cours des expériences in vitro, d'autant plus que les variations individuelles d'un animal à animal obligent à un nombre d'expériences

relativement élevé pour obtenir des résultats interprétables.

La rareté et le caractère fragmentaire des études concernant le cycle tricarboxylique réalisées jusqu'ici *in vivo* peut être attribuée à des facteurs techniques.

Pour mener à bien l'exploration de ce cycle chez l'animal entier, il faut disposer, en effet, de méthodes de dosage qui soient suffisamment sensibles et spécifiques pour être applicables aux liquides biologiques et aux homogénats tissulaires.

Alors que la plupart des travaux effectués jusqu'ici ne comportent que le dosage du seul acide citrique ou, plus rarement, des acides citrique et α -cétoglutarique, nous nous sommes attachés à la mise au point d'une technique de détermination applicable aux autres acides stables du cycle citrique. En raison de l'importance de ces facteurs techniques, nous nous étendrons quelque peu sur le détail des méthodes de dosage utilisées.

- - - - -

- 10 -

TECHNIQUES.

B) METHODES DE DOSAGE DES ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE

Deux modalités de chromatographie sur colonne des acides du cycle citrique ont été décrites. La chromatographie sur résine d'échange anionique (Dowex 1) a été mise au point par Busch, Hurlbert et Potter (1952) au cours d'études sur l'action du malonate (Busch et Potter, 1952 a et b, 1953) sans que la plupart des pics trouvés en chromatographiant des extraits tissulaires aient été identifiés. Frohman, Orten et Smith (1951) ont, de leur côté, décrit la chromatographie des acides du cycle tricarboxylique sur gel de silice et l'ont utilisée pour le dosage de ces acides dans des homogénats tissulaires (Frohman et Orten, 1953).

Ces techniques de chromatographie sur colonne présentent cependant le double inconvénient de ne s'appliquer qu'à des quantités d'acides relativement importantes et d'être longues à effectuer (et, par conséquent, d'être difficilement applicables à des études en série).

Ces raisons nous ont déterminé à donner la préférence à une technique de chromatographie sur papier. Alors qu'un nombre très important de travaux ont été consacrés à la chromatographie sur papier des acides organiques des extraits végétaux (dans lesquels la concentration de ces acides est élevée), très peu d'études ont été réalisées sur des extraits biologiques animaux.

Nous avons mis au point une technique de dosage quantitatif des acides aconitique, succinique, fumarique et malique des milieux biologiques par chromatographie sur papier, et c'est cette technique que nous avons appliquée au cours du présent travail, aussi bien pour l'urine que pour les homogénats tissulaires.

L'acide citrique forme souvent sur les chromatogrammes, non un spot bien limité et arrondi, mais une traînée partant parfois du point de déposition. C'est pourquoi son dosage a été effectué par une technique colorimétrique spécifique et non par chromatographie.

D'autre part, en raison des pertes importantes survenant lorsque l'on chromatographie les acides α -cétoniques à l'état libre, l'acide α -cétooglutarique a été dosé par une technique chromatographique différente, après transformation en 2,4-dinitrophénylhydrazone.

En mettant en oeuvre simultanément ces diverses techniques, nous avons ainsi dosé tous les acides stables du cycle tricarboxylique, à l'exception de l'acide isocitrique. Celui-ci se confond avec l'acide citrique sur les chromatogrammes, les R_f de ces deux acides étant très voisins avec toutes les phases solvantes étudiées jusqu'ici. Leur séparation chromatographique, après transformation préalable de l'acide isocitrique en lactone selon le procédé mis au point par Cheftel, Munier et Madeboeuf (1953), permet l'identification de ces deux acides en présence l'un de l'autre, mais ne nous a pas donné de résultats quantitatifs satisfaisants.

Nous n'avons pas dosé les acides oxalosuccinique et oxaloacétique qui se décomposent avec une telle facilité qu'il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode permettant leur détermination quantitative précise. L'acide oxaloacétique peut, certes, être dosé par décarboxylation en acide pyruvique (par exemple sous l'influence du citrate d'aniline - Greville, 1939- ou d'ions aluminium, - Krebs et Eggleston, 1955) en mesurant soit le CO_2 dégagé (Meister, Sober et Peterson, 1954; Happold et Turner, 1957), soit l'acide pyruvique formé mais, s'il est

ainsi possible de déterminer l'acide oxaloacétique actuellement présent dans un milieu biologique, la fraction de cet acide, qui s'est décarboxylée spontanément entre le moment du prélèvement et celui du dosage, échappe à la détermination.

DETERMINATION DES ACIDES ACONITIQUE, SUCCINIQUE, FUMARIQUE & MALIQUE.

Comme nous l'avons dit plus haut, nous avons effectué la détermination de ces acides par chromatographie sur papier. Lugg et Overell (1947) ont, les premiers, mis au point une technique de papyrographie des acides organiques. Ces auteurs ont observé, en effet, qu'en utilisant des phases solvantes neutres, on obtient non des spots bien définis, mais des traînées dues à la dissociation des acides en plusieurs formes ionisées, alors que cette perturbation peut être supprimée par adjonction d'un acide volatil au solvant. L'acide volatil utilisé dans ce but est habituellement, soit l'acide acétique, soit mieux, l'acide formique. On obtient ainsi des spots bien définis pour la quasi-totalité des acides organiques des milieux biologiques sauf, toutefois, pour l'acide oxalique (Cheftel, Munier et Macheboeuf, 1951), qui forme des traînées même si, comme l'ont fait VAS (1951) ainsi que Martius et Nitz-Litzow (1952), on remplace l'acide formique par l'acide sulfureux.

Notons que l'inconvénient des solvants acides réside dans les phénomènes d'estérification spontanée qui se produisent entre l'alcool et l'acide entrant dans leur composition. Pour obtenir des Rf reproductibles, il est nécessaire de n'utiliser ces solvants qu'après un laps de temps suffisant pour qu'un état d'équilibre de ces phénomènes d'estérification puisse s'établir,

24

comme l'ont montré, en particulier, Lugg et Overell (1948), Jermstad et Jensen (1950), Stark, Goodban et Owens (1951).

Une chromatographie unidimensionnelle est cependant insuffisante pour la séparation des nombreux acides organiques présents dans les milieux biologiques, en particulier dans l'urine. Si la séparation bidimensionnelle avec deux phases solvantes acides a peu d'intérêt, l'ordre de séparation des acides organiques étant habituellement identique (Lugg et Overell 1948), il n'en est pas de même en utilisant successivement une phase solvante alcaline, puis une phase solvante acide (Overell, 1952; Cheftel, Munier et Macheboeuf, 1952), et c'est cette manière de faire que nous avons adoptée.

Alors que la séparation chromatographique elle-même est relativement aisée, des problèmes assez ardues se posent à propos de l'élimination des substances interférentes (nécessaire avant la chromatographie), de l'identification des spots et du dosage quantitatif des acides constituant ces spots.

Le premier temps de l'élimination des substances interférentes (en dehors du cas particulier de l'urine) est la déprotéinisation, qu'il faut réaliser sans adjonction d'un corps tel que l'acide trichloracétique ou l'acide m-phosphorique qui gênerait ultérieurement la chromatographie sur papier. Pour la chromatographie des acides du cycle tricarboxylique sur Dowex 1, Busch, Hurlbert et Potter (1952) déprotéinisent préalablement les homogénats de rein par l'acide perchlorique, puis neutralisent par la potasse et centrifugent à froid pour éliminer l'essentiel de l'acide perchlorique sous forme de perchlorate de potassium, peu soluble en milieu aqueux. Alors que ce procédé est satisfaisant pour la chromatographie sur résine, nous

avons constaté qu'il persiste cependant suffisamment d'acide perchlorique pour gêner la séparation sur papier.

L'interférence due à l'acide perchlorique nous a conduits à étudier deux autres modalités de déprotéinisation, l'une dérivée de celle de Hunter (1956) utilisant le chauffage après adjonction d'acide acétique, l'autre l'acétone à basse température. Ces deux techniques n'apportent aucun élément susceptible de gêner ultérieurement la chromatographie des acides organiques.

Nous avons finalement donné la préférence à la déprotéinisation par l'acétone, qui évite le chauffage, au cours duquel - ainsi que l'ont montré Isherwood et Niavis (1956) à propos des acides α -cétoniques des tissus végétaux - un stade transitoire d'activation précède souvent le stade d'inactivation enzymatique, modifiant ainsi la concentration des acides organiques. C'est vraisemblablement à une telle activation transitoire de la succinodéshydrogénase que l'on peut attribuer le fait que la concentration d'acide succinique est habituellement plus faible, celle d'acide fumarique plus élevée dans les homogénats de foie déprotéinisés par la chaleur après adjonction d'acide acétique que dans ces mêmes homogénats déprotéinisés par l'acétone.

L'élimination des substances interférentes, non protéiques (cations, ampholytes, substances non ionisées, acides minéraux), doit être réalisée dans un deuxième temps. Parmi les trois modalités que nous avons essayées (extraction continue des acides organiques par l'éther; désalification électrolytique; utilisation des échangeurs d'ions) seule, la dernière, nous a donné des résultats satisfaisants.

L'extraction continue des acides organiques par l'éther présente, en effet, l'inconvénient de nécessiter, pour être

totale, un temps considérable (trois jours dans les expériences de Martius et Nitz-Litzow, 1952). Quant à la désalification électrolytique préconisée par Consden, Gordon et Martin (1947) pour l'élimination des sels minéraux avant chromatographie sur papier des acides aminés, nous avons constaté qu'elle détermine des pertes importantes d'acides organiques, même en acidifiant entre pH 2 et 3, comme le recommandent Katz et Chaikoff (1954).

Grâce à l'utilisation d'une colonne de résine d'échange anionique fortement basique (Dowex 2) dans le cycle formiate avec élution par l'acide formique des acides fixés sur la résine, il est possible, par contre, d'éliminer les cations, les ampholytes, les substances non ionisées et une partie des acides minéraux sans déterminer de pertes notables des acides organiques non volatils (Nordmann, Gauchery, Du Ruisseau, Thomas et Nordmann, 1954 a et b). Il est également possible d'utiliser, dans ce but, une résine faiblement basique, Deacidite ou Amberlite IR4B (Osteux et Laturaze, 1954).

L'identification des spots d'acides organiques sur les chromatogrammes a été réalisée par diverses techniques décrites préalablement (Nordmann et coll., 1954 c). En ce qui concerne les révélations différentielles, notons que si les acides succinique, fumarique et malique ne donnent aucune réaction caractéristique sur papier, l'acide aconitique, par contre, est coloré en rose par le p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'anhydride acétique (Nordmann, Du Ruisseau et Nordmann, 1955; Schreier et Hack, 1956), la sensibilité de cette méthode étant de l'ordre de 1 microgramme.

Le dosage quantitatif des acides séparés par chromatographie ne peut être effectué directement sur le papier. En effet, la détermination, d'après la surface des spots, n'est guère applicable pour des chromatogrammes en deux dimensions;

la détermination photométrique par mesure de la coloration des spots n'est utilisable que dans le cas particulier de l'acide aconitique révélé par le p-diméthylaminobenzaldéhyde et non des autres acides révélés par un indicateur de pH (Du Ruisseau, 1955). Il est donc nécessaire d'extraire les acides de leurs spots et de déterminer leur concentration dans ces extraits.

En dehors des techniques spécifiques de dosage, qui ne sont utilisables que pour l'un des acides du cycle tricarboxylique, et qui sont habituellement, soit des méthodes enzymatiques, soit des méthodes colorimétriques généralement peu sensibles, trois modalités de dosage applicables aux divers acides de ce cycle ont été proposées: le dosage fluorométrique (Barr, 1948; Hummel, 1949; Frohman et Orten, 1953), la méthode titrimétrique (Nordmann, Du Ruisseau et Nordmann, 1955), la détermination iodométrique (Dupéron, 1956).

Nous avons appliqué la méthode titrimétrique, qui nous a donné des résultats parfaitement reproductibles à condition d'observer un certain nombre de précautions: emploi de papiers chromatographiques lavés à l'aide d'acides pour éliminer l'essentiel des impuretés alcalines (papier Schleicher et Schühl 2043 b mgl (a) ou Arches 302 lavé à l'acide chlorhydrique 0,1 N); séchage des chromatogrammes dans une atmosphère parfaitement ventilée; titration au pH mètre sous azote en établissant chaque fois la courbe de neutralisation; détermination des pertes chromatographiques pour chaque expérience par chromatographie parallèle de standards isolés et ajoutés aux milieux biologiques.

En dehors de la méthode titrimétrique, nous avons mis à profit la forte absorption dans l'ultra-violet des acides aconitique et fumarique (Racker, 1950; Marshall et Drew, 1950) pour déterminer leur concentration dans l'extrait des spots

par mesure de cette absorption. Ceci permet pour ces deux acides un contrôle des résultats obtenus par titration, les deux méthodes étant appliquées simultanément sur un aliquot de l'extrait des spots.

Dans une première série d'expériences (Tableau 1), nous avons étudié l'absorption à 240 mμ d'extraits de papier Schleicher et Schühl 2043 b pour déterminer l'absorption des "blancs" obtenus dans diverses conditions (pour toutes les expériences comportant la détermination des acides aconitique et fumarique par mesure de l'absorption dans l'ultra-violet, le papier S. et S. 2043 b mg1/a a été utilisé exclusivement). On constate que l'absorption n'augmente pas considérablement lorsque le papier a été en contact avec le solvant alcalin (Ethanol-Ammoniaque/Eau); cette absorption est, au contraire, fortement accrue après contact avec le solvant acide habituellement utilisé (n-propanol-Eucalyptol-Acide formique-Eau), l'absorption étant due essentiellement à l'eucalyptol, comme le démontre la comparaison avec les solvants propanol/acide formique/eau ou butanol/acide formique/eau. Enfin la révélation par le vert de bromocrésol détermine un accroissement considérable de l'absorption à 240 mμ.

Ces constatations nous ont conduits à remplacer la phase solvante n-propanol-eucalyptol-acide formique-eau par le solvant butanol-acide formique-eau pour les chromatogrammes comportant la détermination des acides aconitique ou fumarique par mesure de l'absorption dans l'ultra-violet.

Les conditions d'élimination de la gêne apportée par le vert de bromocrésol ont été précisées ensuite. Il serait certes possible pour localiser les spots aconitique et fumarique sur le chromatogramme non révélé de se servir d'un chromatogramme

TABEAU I.

ABSORPTION A 240 m μ DE "TEMOINS PAPIER" SCHLÖTHER
ET SCHUHL 2043 b mgl (a) (CARRÉS DE PAPIER DE 4 x 4 cm.)
 (Extraction par 10 cm³ d'eau bidistillée, puis adjonction
 de soude jusqu'à pH 8,0)

Densité optique (moyenne de 3 déterminations)
 (cuves de quartz de 1 cm. d'épaisseur)

I) CHROMATOGRAMMES NON REVELÉS :

A) Avant chromatographie :
 0,036

B) Après chromatographie avec la phase solvante 1 :
 0,072

C) Après chromatographie avec la phase solvante 2 :
 0,344

D) Après chromatographie avec la phase solvante 3 :
 0,071

E) Après chromatographie avec la phase solvante 4 :
 0,066

II) CHROMATOGRAMMES REVELÉS PAR LE VERT DE BROMOCRESOL A 0,1 %:

A) Après chromatographie avec la phase solvante 2 :
 0,481

B) Après chromatographie avec la phase solvante 4 :
 0,212

Phase solvante 1 : ethanol abs. (50 vol.), Ammoniacue 22°Bé (15
 vol.), Eau (5 vol.)
 " " 2 : n-propanol (50 vol.), Acide formique 98 % (20
 vol.), Eucalyptol (50 vol.), Eau (o.s. 1er trouble)
 " " 3 : Idem que 2 sans eucalyptol
 " " 4 : butanol (95 vol.), Acide formique 98 % (5 vol.),
 Eau (o.s. pour saturation)

guide, qui serait réalisé parallèlement et qui lui serait révélé par le vert de bromocrésol. Cette méthode est cependant imparfaite, de petites variations de Rf se rencontrant parfois sur les chromatogrammes en deux dimensions, même réalisés parallèlement, et risquant ainsi de fausser le repérage des spots. Il est encore possible de révéler le chromatogramme et de soustraire de l'absorption lue sur l'extrait des spots aconitique ou fumarique celle d'un extrait d'un fragment de papier de même surface découpé à distance de tout spot; cette méthode est cependant délicate, car elle ne donne de résultats valables que si la révélation est parfaitement homogène sur toute la surface du chromatogramme.

Nous avons donc recherché une autre méthode de correction pour l'absorption du vert de bromocrésol. Le spectre d'absorption de ce colorant met en évidence à pH 8 trois pics d'absorption situés à 305,400 et 620 m μ , longueurs d'ondes auxquelles l'absorption des acides aconitique et fumarique est négligeable. Il est possible d'établir une courbe de correspondance entre l'absorption du colorant à l'une de ces longueurs d'ondes et celle qui serait déterminée à 240 m μ (figure 2).

Pour apprécier la part revenant au vert de bromocrésol dans l'absorption d'un extrait d'un spot aconitique ou fumarique mesurée à 240 m μ , nous déterminons donc également l'absorption de cet extrait à 305,400 ou 620 m μ , et recherchons sur la courbe précédente l'absorption correspondante à 240 m μ . Avec le spectrophotomètre Beckman, modèle DU, que nous avons utilisé, la mesure à 305 m μ est la plus commode, car elle évite d'avoir à remplacer la source d'ultra-violet par la source lumineuse visible. En raison de l'influence du pH sur l'absorption du vert de bromocrésol, toutes les mesures d'absorption ont été faites après avoir amené le pH des échantillons à 8,0 par adjonction de soude.

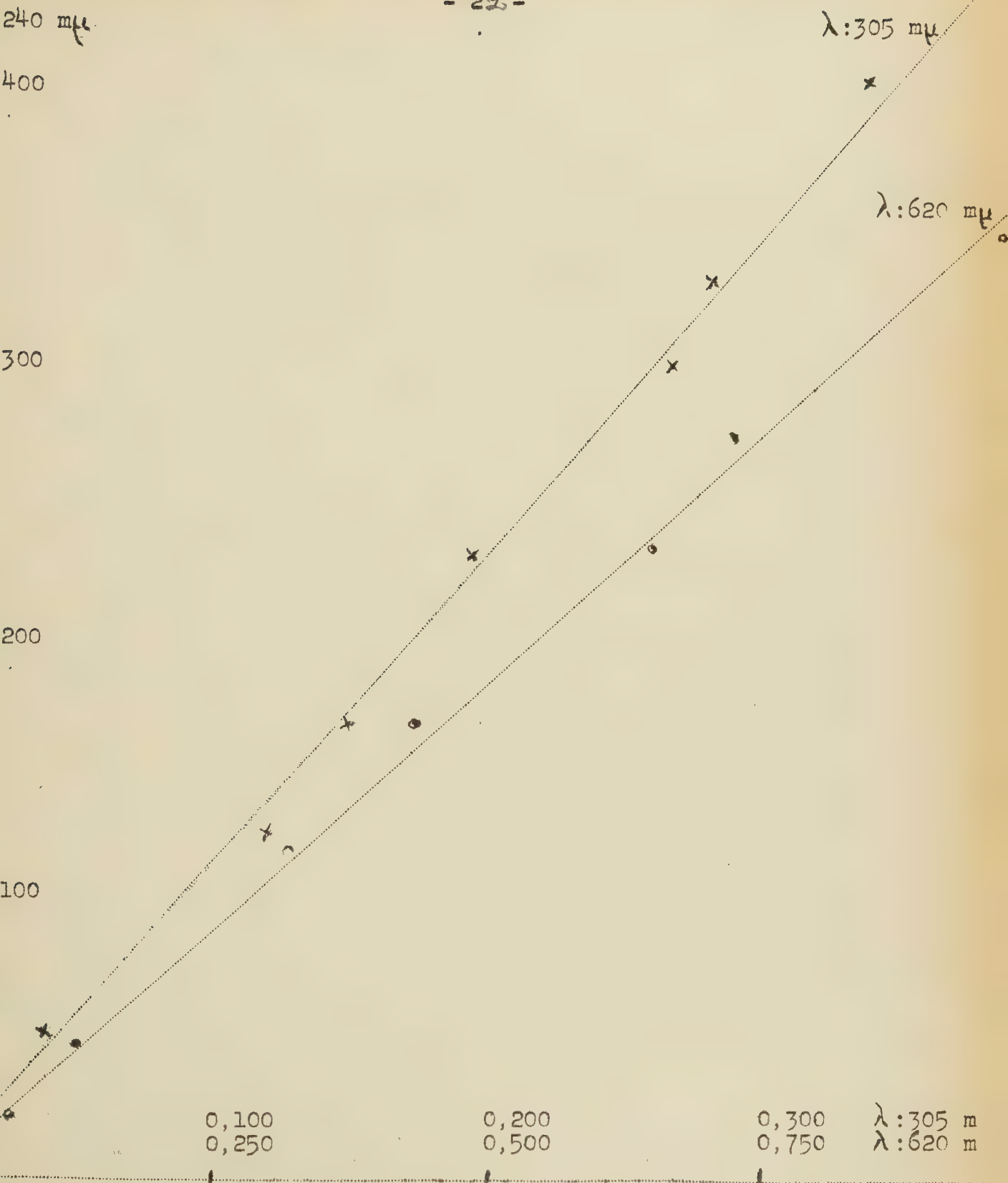
FIGURE 2

VERT DE BROMOCRESOL :

COURBES DE CONVERSION DES DENSITES OPTIQUES DETERMINEES

A 305 m μ OU A 620 m μ .

EN DENSITES OPTIQUES CORRESPONDANTES A 240 m μ .



TABEAU 2.

ABSORPTION A 240 mμ DE STANDARDS D'ACIDE TRANS-ACONITIQUE.

(Après chromatographie sur S. et S. 2043 b mg/l/a avec la phase solvante butanol (95 vol.), acide formique 98% (5 vol.), eau (qs. pour saturation); révélation par le vert de bromocrésol à 0,1%, extraction des spots par 10 cm³ d'eau bidistillée et ajustement du pH à 8,0).

DIVERSES MODALITES DE CORRECTION POUR L'ABSORPTION DU VERT DE BROMOCRESOL

Conc. de l'ac.acon. (en μg./cm ³)	10	20	30	40
Absorption lue à 240 mμ (Densité optique)	0,569	0,708	1,068	1,392
I) Correction par soustraction de l'absorption à 240 mμ d'un "témoin papier" de même surface:				
Absorption du témoin	0,352	0,262	0,344	0,499
Absorption après déduction du "témoin papier"	<u>0,217</u>	<u>0,446</u>	<u>0,724</u>	<u>0,893</u>
II) Correction à partir de l'absorption mesurée à 305 mμ:				
Absorption lue à 305 mμ	0,293	0,218	0,329	0,432
Absorption correspondante à 240 mμ (cf. figure 2):	0,334	0,250	0,374	0,490
Absorption à 240 mμ due à l'acide aconitique:	<u>0,235</u>	<u>0,458</u>	<u>0,694</u>	<u>0,902</u>
III) Correction à partir de l'absorption mesurée à 620 mμ:				
Absorption lue à 620 mμ	0,925	0,680	0,942	1,358
Absorption correspondante à 240 mμ (cf. figure 2)	0,332	0,250	0,388	0,478
Absorption à 240 mμ due à l'acide aconitique:	<u>0,237</u>	<u>0,458</u>	<u>0,680</u>	<u>0,914</u>

Le tableau 2 indique l'absorption corrigée à 240m μ d'extraits de spots d'acide aconitique, la correction pour la part revenant au vert de bromocrésol étant établie d'une part par soustraction d'un "témoin papier" découpé sur le même chromatogramme, d'autre part d'après l'absorption lue soit à 305 m μ , soit à 620 m μ .

On constate que les résultats obtenus par l'une ou l'autre des modalités de correction sont identiques. Au cours d'autres expériences, cependant, pour lesquelles l'homogénéité de la révélation était moins parfaite, les chiffres obtenus par correction à partir de l'absorption mesurée à 305 ou 620 m μ se sont révélés également satisfaisants, tandis que ceux calculés par soustraction d'un témoin papier découpé sur le même chromatogramme étaient aberrants, du fait de l'inégalité de concentration du vert de bromocrésol sur toute la surface du chromatogramme.

Réalisation pratique du dosage des acides aconitique,
succinique, fumarique et malique.

1) Déprotéinisation des homogénats tissulaires.

Les homogénats de foie et de rein ont été additionnés de 2 volumes d'acétone préalablement refroidie aux environs de 0°C. Après centrifugation à 2°C (dans une centrifugeuse réfrigérée MSE) pendant 5 minutes à 800 g, le culot protéique a été lavé par un volume d'acétone/eau (2/1,v/v) égal à 1,5 fois celui de l'homogénat. Après nouvelle centrifugation analogue à la première, les deux surnageants ont été réunis.

2) Elimination des substances interférentes non protéiques.

a) Préparation des colonnes de résine.

Nous utilisons des colonnes de Dowex 2, X-10, de 40 mm. de hauteur et de 4 mm. de diamètre, le diamètre des particules correspondant à 60-80 mesh USA.

Avant la première utilisation, on fait passer sur chaque colonne, à trois reprises, 5 cm³ d'acide chlorhydrique N, 25 cm³ d'eau, 5 cm³ de soude 0,5 N et 25 cm³ d'eau, selon le procédé recommandé par Samuelson (1952, p.95) pour éliminer les impuretés de la résine. Celle-ci est alors transférée dans le cycle formiate par passage de 50 cm³ de formiate de sodium M, suivis de 250 cm³ d'eau.

b) Passage sur colonne du liquide à analyser.

Pour les homogénats hépatiques ou rénaux, on fait passer sur la colonne (à raison de 0,4 cm³/minute) un volume d'homogénat déprotéinisé correspondant à un poids de tissu frais de 1 à 5 g., suivi de 15 cm³ d'un mélange acétone (2 vol.)/eau (1 vol.).

Pour l'urine, le volume passé sur colonne est calculé en prenant pour base de référence la teneur de l'urine en créatinine, de façon à minimiser l'influence des variations de dilution urinaire. La créatinine a été dosée par la technique de Owen, Iggo, Scandrett et Stewart (1954). On met en expérience le volume d'urine contenant soit 2 mg, soit 0,5 mg de créatinine selon qu'il s'agit d'une urine sans charge ou d'une urine recueillie après administration d'un acide du cycle tricarboxylique. Ce volume est suivi de 15 cm³ d'eau.

c) Elution des acides fixés sur la résine.

Après rejet de l'effluent, l'élution est effectuée par passage de 10 cm³ d'acide formique 12 N. L'éluat est alors concentré dans une étuve à 40°C en présence d'un mélange de soude (1 partie) et de chlorure de calcium anhydre (2 parties).

d) Régénération des colonnes de résine.

Elle est assurée par passage de 30 cm³ de formiate de sodium 3 M, suivis de 100 cm³ d'eau.

3) Chromatographie sur papier.

L'éluat concentré est repris en totalité et déposé sur papier Schleicher et Schühl 2043 b mg1/a (lavé industriellement) ou Arches 302 préalablement lavé (séjour de 3 h. dans un bain d'acide chlorhydrique 0,1 N, puis lavage à l'eau bidistillée jusqu'à disparition de la positivité de la réaction de caractérisation des chlorures par le nitrate d'argent.

La chromatographie est effectuée par voie ascendante, à 24° ± 1°C, en 2 dimensions, pendant 14 à 16 heures pour chacun des développements.

La phase solvante utilisée pour la première dimension est composée d'ethanol absolu (80 vol.), ammoniacque 22° Bé (soit 21,6% de NH₃) (15 vol.), eau (5 vol.). Pour la deuxième dimension on a recours à une phase solvante acide composée de n-propanol (50 vol.), eucalyptol (50 vol.), acide formique 98% (20 vol.), eau (quantité juste suffisante pour l'obtention du premier trouble persistant) (Cheftel, Munier et Macheboeuf, 1951). On laisse reposer ce solvant acide pendant 48 heures avant de prélever la phase supérieure qui est utilisée pour la chromatographie.

Après chacun des développements, les chromatogrammes sont séchés pendant 4 h. à la température du laboratoire dans une atmosphère ventilée. La révélation est effectuée par un indicateur de pH (habituellement le vert de bromocrésol à 0,1%) ou par une méthode de révélation différentielle.

4) Dosage quantitatif des acides aconitique, succinique, fumarique et malique par titration après séparation chromatographique.

Les spots découpés sur les chromatogrammes révélés par le vert de bromocrésol sont extraits par 10 cm³ d'éthanol (20 vol.)/eau (80 vol.) puis on titre au pH mètre, sous azote, avec de la soude 0,01 N. La soude est ajoutée par fractions de 0,01 cm³, le point final de la titration correspondant au maximum Δ pH, c'est-à-dire, à l'addition de la fraction de 0,01 cm³ NaOH soude qui détermine la plus forte variation de pH (Kolthoff et Laitinen, 1948, p. 109).

Toutes les déterminations sont effectuées en double, d'une part sur l'homogénat ou l'urine sans addition de standards, d'autre part sur le même liquide biologique additionné de 200 µg de chacun des acides aconitique, succinique, fumarique et malique. Ces mêmes standards sont également chromatographiés seuls après passage sur colonne de Dowex 2, ce qui permet de calculer les pertes survenant lors de l'échange anionique et lors de la chromatographie sur papier. Les chiffres obtenus sur les extraits des spots urinaires sont corrigés en fonction de ces pertes. Pour les homogénats, ils le sont en fonction des résultats obtenus lors de l'adjonction des standards à l'homogénat, de façon à tenir compte également des pertes de déprotéinisation. En raison de l'acidité du papier chromatographique, on détermine de plus,

FIGURE 3.

DENSITES OPTIQUES A 240 m μ DE STANDARDS D'ACIDE

TRANS-ACONITIQUE (courbe en trait plein)

ET D'ACIDE FUMARIQUE (courbe en tirets).

(Détermination en cuves de quartz de 1 cm. d'épaisseur
avec le spectrophotomètre Beckman DU).

x : standards non chromatographiés

o : standards déposés sur un fragment de papier S. et S.

2043 b mg/l (a) de 4 x 4 cm., puis extraits par 10 cm³
d'eau. Chiffres corrigés par soustraction de l'absorp-
tion d'un "témoin papier" de même surface.

. : standards chromatographiés avec la phase solvante
butanol (95 vol.), acide formique 98 % (5 vol.), eau
(q.s. pour saturation), puis extraits comme précédem-
ment après révélation par le vert de bromocrésol.

Chiffres corrigés à l'aide d'une lecture de l'absorp-
tion à 305 m μ et détermination de l'absorption corres-
pondante à 240 m μ à l'aide de la courbe de la figure 2.

Densité optique
à 240 m μ

0,400

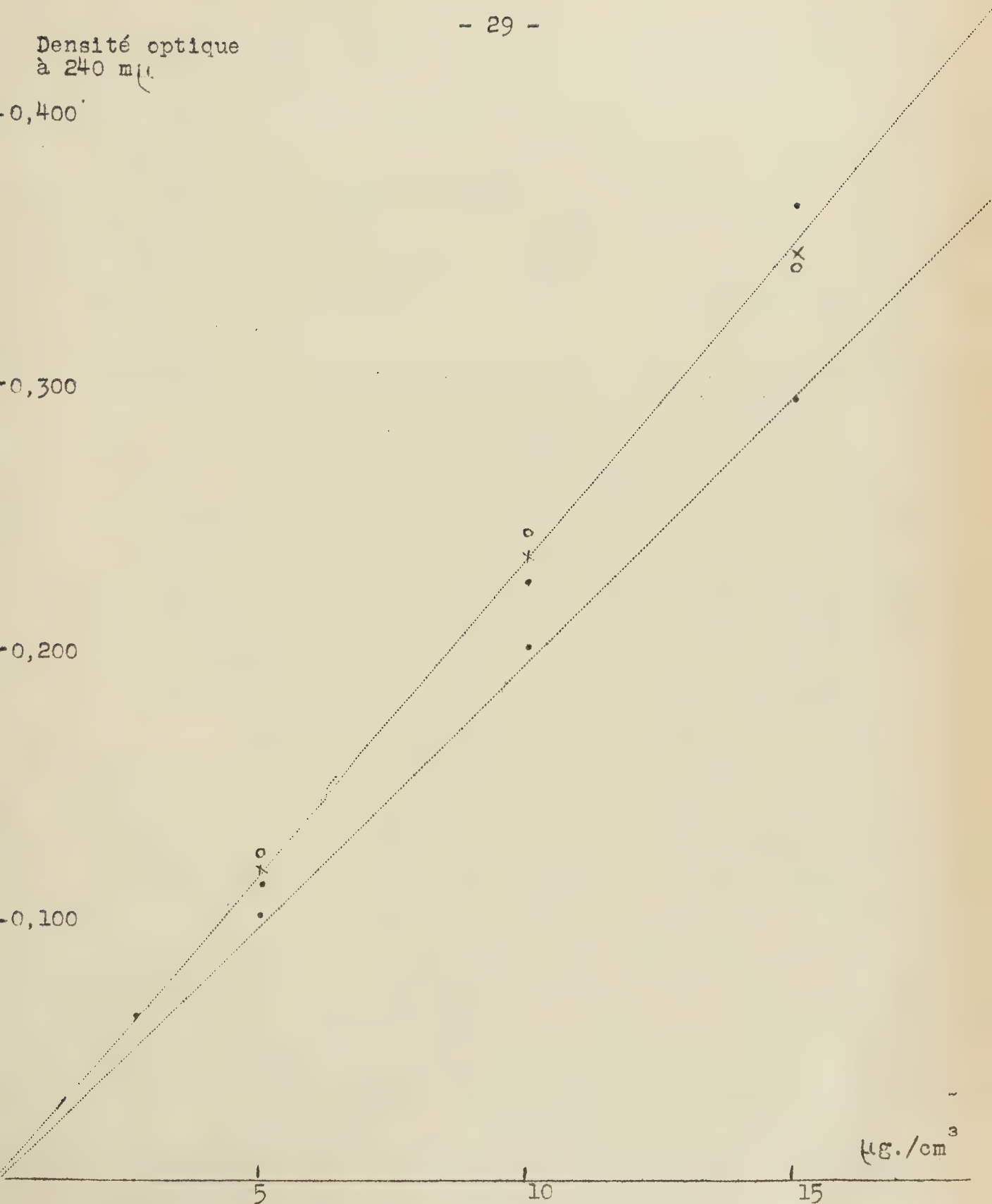
0,300

0,200

0,100

$\mu\text{g./cm}^3$

5 10 15



dans chaque cas, l'acidité d'un "témoin papier" (extrait d'un fragment de papier de même surface que celle des spots) qui est soustraite de celle des spots.

Le calcul de l'erreur expérimentale de la méthode et l'étude de la récupération de standards ajoutés aux milieux biologiques ont été décrits précédemment (Du Ruisseau, 1955).

5) Dosage quantitatif des acides aconitique et fumarique par détermination de l'absorption dans l'ultra-violet.

L'absorption de l'extrait des spots (amené à pH 8,0) est mesurée à 240 et à 305 m μ . Le dernier chiffre permet de déterminer la part revenant au vert de bromocrésol (fig.2). Le chiffre de densité optique à 240 m μ ainsi corrigé est alors rapporté sur la courbe d'absorption des standards d'acide aconitique ou fumarique (fig.3).

DETERMINATION DE L'ACIDE CITRIQUE.

La plupart des techniques de détermination de l'acide citrique sont des méthodes colorimétriques basées sur la transformation de l'acide en pentabromoacétone (Stahre, 1895) et la conversion de cette dernière en un complexe coloré.

Saffran et Denstedt (1948) ont décrit une technique colorimétrique très différente, mettant à profit la réaction de Fürth et Herrmann (1935) (coloration rose à chaud avec la pyridine et l'anhydride acétique), réaction dont le mécanisme reste inconnu.

La méthode de Saffran et Denstedt présente l'avantage d'être facile et rapide à exécuter, mais les essais que nous avons effectués sur l'urine ont montré que la reproductibilité, de même que la récupération de quantités d'acide citrique ajoutées à l'urine étaient très imparfaites. Stern (1957) conclut également que cette méthode simple manque de spécificité et d'exactitude. Les essais effectués avec la méthode de Nekhorocheff et Wajzer (1953), dérivée de celle de Saffran et Denstedt, ne nous ont pas donné de meilleurs résultats.

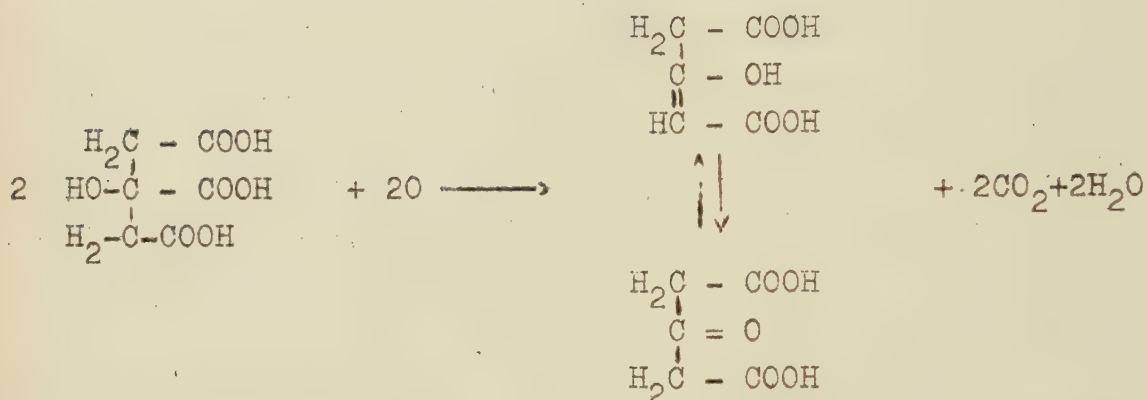
Nous avons, de ce fait, eu recours à une technique basée sur l'estimation colorimétrique de la pentabromoacétone formée à partir de l'acide citrique.

De multiples modalités ont été décrites depuis que Pucher, Sherman et Vickery (1936) ont, les premiers, appliqué ce principe à la détermination de l'acide citrique dans les milieux biologiques. Toutes ces techniques comportent deux étapes successives.

Au cours de la première, l'acide citrique est transformé en pentabromoacétone. Dans ce but, l'acide citrique est tout d'abord décarboxylé en acide acétonedicarboxylique en milieu fortement acide grâce à l'action d'un oxydant. L'acide acétonedicarboxylique est transformé rapidement en pentabromoacétone en présence de brome.

Ces réactions peuvent être représentées par le schéma suivant (Gey, 1952, 1953):

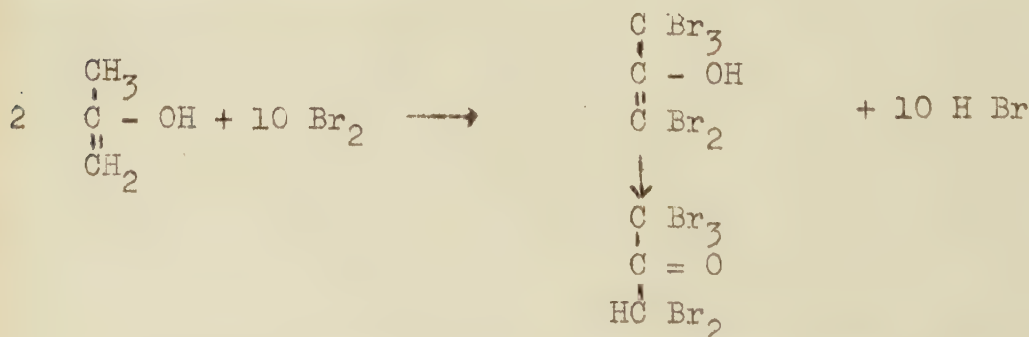
1) Oxydation et décarboxylation de l'acide citrique:



2) Décarboxylation spontanée ou oxydative de l'acide acétonedicarboxylique, exclusivement sous sa forme cétonique:



3) Bromuration de l'acétone sous sa forme énolique, réaction se produisant aussitôt après la décarboxylation de l'acide acétonedicarboxylique:



La pentabromoacétone, ainsi constituée, est extraite du milieu acide où elle se trouve en solution, à l'aide d'un solvant

approprié puis, au cours de la seconde étape de la détermination, est évaluée colorimétriquement.

Au cours de ces deux étapes, les différentes méthodes se distinguent aussi bien par les conditions de réaction que par les réactifs utilisés, et l'accord est loin d'être réalisé sur les uns et les autres.

Les oxydants les plus employés actuellement sont le permanganate de potassium (Natelson, Lugovoy et Pincus, 1947; Gey, 1952, 1953) et le vanadate d'ammonium ou de sodium (Weil-Malherbe et Bone, 1949; Taylor, 1953; Mc Ardle, 1955), dont l'emploi a été suggéré par Pozzi-Escot (1946). Cet auteur avait constaté que l'acide vanadique, à l'état de traces, catalysait l'oxydation de l'acide citrique en acide acétonedicarboxylique par le chlorate. Le rôle du chlorate dans cette réaction est vraisemblablement de réoxyder l'ion vanadyl réduit. Dans ces conditions, l'on pouvait s'attendre à ce que l'oxydation se produise en présence d'une quantité suffisante de vanadate, mais en l'absence de chlorate et c'est là ce qui se produit en fait.

En ce qui concerne l'oxydation par le permanganate, les conditions de réaction sont discutées et, parmi les auteurs utilisant cet oxydant, les uns recommandent d'éviter tout excès de permanganate, les autres, au contraire, d'agir en présence d'un excès de permanganate.

L'accord n'est pas réalisé non plus sur la concentration optima du milieu en acide. Suivant les auteurs, celle-ci varie de 1,5 N à 16,5 N. Selon Mc Ardle (1955), la sensibilité augmente parallèlement à l'accroissement de l'acidité du milieu, l'optimum étant atteint pour une concentration en acide sulfurique de 16,5 N. Au-dessus de 17 N, la sensibilité diminue.

Selon Gey (1953), il n'est indispensable d'opérer en milieu fortement acide que lorsqu'on utilise des réducteurs violents pour éliminer l'excès de brome et d'oxydant, cette élimination étant l'une des phases les plus critiques du dosage. Gey proscriit l'utilisation de réducteurs tels que l'hydrazine, l'hyposulfite ou le nitrite de sodium qui, en présence d'oxydants, sont capables de détruire une partie de la pentabromoacétone formée, et ceci dans des proportions absolument incontrôlables. Selon Taylor (1953), le sulfate ferreux ne présente pas les inconvénients de l'hyposulfite, et ceci, même s'il se trouve en excès. Pour éliminer l'excès de brome et d'oxydant (permanganate), Gey (1952) préconise, de son côté, l'eau oxygénée à 3%.

Quel que soit le moyen utilisé pour éliminer l'excès de brome, tous les auteurs insistent sur le fait que cette élimination doit être totale, la moindre trace de brome persistant au-delà de ce stade faussant totalement le dosage.

Le temps suivant consiste à extraire la pentabromoacétone du milieu acide où elle se trouve en solution. La plupart des auteurs utilisent, dans ce but, soit l'éther de pétrole à point d'ébullition élevé (30-100°C), soit l'heptane (Ettinger, Goldbaum et Smith, 1952). On peut également utiliser de l'éther de pétrole à point d'ébullition moins élevé (Gey, 1953).

Avant d'effectuer la détermination colorimétrique de la pentabromoacétone ainsi extraite, il importe encore d'éliminer rigoureusement les moindres traces d'acide qui pourraient contaminer le solvant organique, dans lequel elle a été extraite. Cette élimination peut être réalisée en ajoutant une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, ou en lavant l'éther de pétrole avec de l'eau distillée, ou encore en combinant ces deux procédés (Mc Ardle, 1955). On peut également laver l'éther de

pétrole successivement avec de l'eau distillée et un tampon phosphate de pH 7,0 (Gey, 1953).

La solution étant rigoureusement neutre, on peut alors procéder à l'évaluation colorimétrique de la pentabromoacétone. Cette détermination colorimétrique peut être réalisée par divers procédés, sur les mérites et inconvénients desquels l'unanimité n'est pas faite.

Les principales de ces modalités sont les suivantes:

1) En présence de monosulfure de sodium, la pentabromoacétone donne lieu à une coloration jaune, que l'on peut déterminer spectrophotométriquement à 450 mμ (Weil-Malherbe et Bone, 1949; Taylor, 1953). Le monosulfure agirait en libérant le brome en combinaison dans la pentabromoacétone, le brome étant alors évalué colorimétriquement en solution aqueuse (Gey, 1953).

2) En présence d'iodure en solution alcoolique, le brome de la pentabromoacétone est progressivement remplacé par l'iode. L'iode substitué peut être libéré et évalué photométriquement en tant qu'iode moléculaire (Tausky et Shorr, 1947).

3) La pentabromoacétone forme, avec la thiourée, un complexe coloré en jaune en milieu alcalin (Natelson, Pincus et Lugovoy, 1948). L'extinction maxima de ce complexe est située à 430 mμ (Elliott in Stern, 1957).

4) La pentabromoacétone donne une coloration rouge en milieu alcalin en présence de pyridine (Ettinger, Goldbaum et Smith, 1952).

Il ressort du travail de Gey (1953) que la méthode à l'iode est de très loin supérieure aux autres, du point de vue de la sensibilité; elle permet de déterminer des quantités d'acide citrique de l'ordre de 0,1 μg. Mais elle ne donne de résultats

cohérents et reproductibles que dans certaines conditions de réaction bien définies et en l'absence de toute substance capable de former un composé cétonique bromé (par exemple acide β -hydroxybutyrique). Elle n'est donc applicable que dans certains cas particuliers et se prête mal à la détermination de l'acide citrique dans les milieux biologiques où existent de multiples substances interférentes.

La méthode utilisant le monosulfure de sodium donne des résultats reproductibles et applicables aux milieux biologiques complexes, à condition d'observer un certain nombre de précautions. C'est ainsi qu'il est indispensable de rincer les cristaux de monosulfure avant de les mettre en solution, de façon à éliminer les impuretés (thiosulfate, en particulier) pouvant se trouver à leur surface, et qui pourraient être responsables de résultats aberrants. D'autre part, la coloration étant photosensible, il importe de protéger les tubes de la lumière, surtout lorsque l'éclairage est intense. La coloration est encore influencée par la température et Weil-Malherbe et Bone (1949) recommandent de standardiser la température à 18°C pour obtenir des résultats reproductibles. Selon les mêmes auteurs, il est indispensable de ne pas prolonger le temps d'extraction de la pentabromoacétone par le monosulfure au-delà d'une minute, car sans quoi on observe une diminution progressive de l'intensité de la coloration. Les lectures spectrophotométriques doivent enfin être faites de 15 à 30 minutes après l'extraction, car la coloration est maxima à ce moment (Taylor, 1953).

Les techniques utilisant la thiourée (thiourée + borate, Gey, 1953, ou thiourée + borate + monosulfure de sodium, Mc Ardle, 1955) donnent également des résultats reproductibles et applicables aux milieux biologiques.

Réalisation pratique du dosage de l'acide citrique.

La déprotéinisation des homogénats hépatiques ou rénaux est réalisée par addition d'acide trichloracétique à 1% p/v (2 vol. d'acide trichloracétique pour 1 vol. d'homogénat). Après centrifugation, un aliquot du surnageant est concentré au four à 120°C jusqu'à un volume de 2 à 3 cm³, puis complété à 5 cm³ avec de l'acide sulfurique N.

Les urines sont diluées au 1/5 ème avec de l'acide sulfurique normal, ou au 1/10 ème si ces urines sont supposées contenir de fortes quantités d'acide citrique. On met en expérience 5 cm³ de l'une ou l'autre de ces dilutions, soit 1 cm³ ou 0,5 cm³ d'urine.

On effectue parallèlement tous les temps de la méthode sur des standards d'acide citrique : 50, 100 et 200 µg en solution dans 5 cm³ d'acide sulfurique N.

Les échantillons, placés dans des tubes à bouchon rodé, sont additionnés de 5 cm³ d'acide sulfurique 27 N puis, après 10 minutes, on ajoute 5 cm³ d'une solution aqueuse de bromure de potassium (19,836 g/l), bromate de potassium (5,440 g/l) et métavanadate d'ammonium (12,0 g/l). Les tubes sont alors placés pendant 20 minutes dans un bain-marie à 50°C.

Après refroidissement à la température ambiante, on ajoute 2 cm³ d'une solution fraîchement préparée de sulfate ferreux 22% (p/v) dans l'acide sulfurique normal. On retourne alors plusieurs fois les tubes de façon à éliminer toutes les traces de brome pouvant adhérer aux parois. Après 10 minutes, on ajoute 7 cm³ d'heptane, puis on agite mécaniquement les tubes pendant 2 minutes, de façon à extraire, dans l'heptane, la pentabromoacétone se trouvant en solution dans la phase aqueuse. On aspire

alors avec une pipette l'essentiel de l'heptane, que l'on introduit dans un tube à centrifuger contenant une pincée de sulfate de sodium anhydre.

Après centrifugation, on prélève 5 cm³ de l'heptane que l'on introduit dans un nouveau tube à bouchon rodé. On ajoute alors 3 cm³ d'une solution refroidie dans la glace de monosulfure de sodium à 2% (p/v) fraîchement préparée à partir de cristaux rincés et séchés. Les tubes sont alors agités mécaniquement pendant 1 minute exactement, puis la phase inférieure est introduite dans une cuve du spectrophotomètre. Les tubes sont protégés de la lumière jusqu'à la lecture de la densité optique, qui est effectuée à 450 mμ de 15 à 30 minutes après la fin de l'extraction.

Les résultats sont interprétés en fonction de la courbe des standards, qui est une droite passant par l'origine.

DETERMINATION DE L'ACIDE α -CETOGLUTARIQUE

La plupart des techniques de détermination de l'acide α -cétoglutarique sont basées sur la formation de la 2,4-dinitrophénylhydrazone de cet acide, qui donne une coloration rouge en milieu alcalin.

Le dosage spécifique de l'acide α -cétoglutarique par ce procédé nécessite l'élimination de l'interférence due aux autres 2,4-dinitrophénylhydrazones, qui se forment parallèlement lors de la mise en présence d'un liquide biologique avec un excès de 2,4-dinitrophénylhydrazine, et dont les plus importantes sont les hydrazones des acides pyruvique et acétoacétique.

L'acide acétoacétique peut être facilement éliminé par chauffage de l'échantillon à analyser avant incubation avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (Lestradet et Guest, 1951; Marquees

1951).

L'interférence due à l'hydrazone de l'acide pyruvique est beaucoup plus gênante lors des dosages colorimétriques. Plusieurs modalités ont été proposées pour éviter ou pallier cette interférence (Friedemann et Haugen, 1943). Elles reposent, soit sur la différence de vitesse de formation des hydrazones des acides α -cétoglutarique et pyruvique, soit sur leur solubilité différente dans certains solvants organiques, soit encore sur la différence des courbes d'absorption de ces deux hydrazones.

Les essais que nous avons entrepris avec deux techniques dérivées de celle de Friedemann et Haugen (celle de Goodwin et Williams, 1952, d'une part, celle de Koepsell et Sharpe, 1952, de l'autre) ne se sont pas révélés satisfaisants pour le dosage de l' α -cétoglutarate. En effet, en ajoutant à des échantillons d'urine des mélanges en proportion variable des acides pyruvique et α -cétoglutarique, nous avons trouvé des récupérations différant dans certains cas extrêmes de 40% des quantités mises en expérience pour l'acide α -cétoglutarique.

Nous avons, de ce fait, abandonné ces méthodes au profit d'une technique chromatographique qui, seule, permet une séparation satisfaisante entre les hydrazones pyruvique et α -cétoglutarique.

Depuis les premiers travaux de Cavallini, Frontali et Toschi (1949 a et b), un grand nombre de techniques utilisant la chromatographie sur papier ont été décrites. Elles diffèrent essentiellement dans le choix des modalités d'extraction des hydrazones, ainsi que des phases solvantes utilisées lors de la chromatographie. Un certain nombre d'écueils doivent cependant être évités pour empêcher les pertes en acides α -cétoniques,

ainsi que la formation d'artefacts comme l'ont souligné, en particulier, Cavallini et Frontali (1953), Kyamme et Hellman (1954), Marquees (1955), Mondovi, Antonini et Modiano (1955), Kun et Garcio-Hernandez (1957).

C'est ainsi que, lors de l'extraction des hydrazones, il convient de ne pas opérer en milieu acide, ce qui entraînerait des pertes portant, en particulier, sur l'hydrazone de l'acide pyruvique (Marquees, 1955). A l'inverse, si l'on opère en milieu ammoniacal, il faut éviter un contact prolongé entre l'ammoniaque et les hydrazones, de façon à éviter la formation d'artefacts (Towers et Mortimer, 1954; Dassonville, 1955).

Un autre point important est la sensibilité des hydrazones à la température, qui doit faire éviter leur exposition à une température excessive (notamment lors de la déposition sur papier), ainsi qu'à la lumière.

La méthode que nous avons utilisée est celle de El Hawary et Thompson (1953, 1954), qui comporte l'extraction des hydrazones successivement dans l'acétate d'éthyle, puis dans le carbonate de sodium, l'excès de 2,4-dinitrophénylhydrazine étant alors éliminé par une nouvelle extraction par l'acétate d'éthyle. On neutralise ensuite la phase carbonatée par adjonction d'acide chlorhydrique concentré, en évitant de passer en pH acide en raison des pertes qui pourraient en résulter, puis on extrait les hydrazones par l'acétate d'éthyle, on concentre sous vide à 40°C et on reprend le résidu dans la soude 0,1 N, à laquelle on ajoute un tampon phosphate pH 7,2 avant d'en déposer un aliquot pour la chromatographie.

Cette technique présente l'inconvénient d'être longue à effectuer, en raison des multiples extractions qu'elle comporte.

Nous l'avons cependant préférée à celle de Biserte et Dassonville (1956), que nous avons également testée. Cette dernière est, certes, beaucoup plus rapide, les hydrazones étant extraites par l'éther, qui est facilement évaporé, puis reprises dans l'ammoniaque N. Il suffit, avant de déposer sur papier un aliquot de la solution ammoniacale contenant les hydrazones, de faire une extraction chloroformique pour éliminer l'excès de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Cependant, des expériences comportant l'adjonction de standards d'acide α -cétoglutarique à des échantillons d'urine nous ont montré que la récupération était habituellement moins satisfaisante et les résultats plus irréguliers avec cette technique rapide qu'avec celle de El Hawary et Thompson.

En raison de la labilité des acides α -cétoniques, il convenait de préciser particulièrement à leur propos, le problème de la conservation des urines, qui s'avère essentiel, nos expériences portant sur des urines de 24 heures.

Les conditions de stabilisation du taux des acides α -cétoniques sanguins ont été étudiées, en particulier, par Long (1944), qui préconise l'emploi simultané d'un tampon citrate sec de pH 4,0; de fluorure de sodium et de bromure de cétyltriméthylammonium (cétavlon). Dassonville (1955) utilise ce mélange de Long pour la stabilisation des acides α -cétoniques de l'urine, mais la quantité du mélange à utiliser étant fonction du volume urinaire, cette technique de stabilisation n'est pas utilisable pour des urines de 24 heures, dont on ne peut prévoir le volume; de plus, l'utilisation d'un tampon citraté perturberait le dosage de l'acide citrique, que nous effectuons simultanément sur les mêmes urines. Les conditions préconisées par Vinet et Raoul (1942) pour la stabilisation des acides α -cétoniques sanguins (fluorure de sodium + monoiodacétate de sodium

avec refroidissement immédiat dans un bain-marie à 4°C) ne sont guère plus applicables à des urines de 24 heures.

De nombreux auteurs (Friedemann et Haugen, 1943; Lee et Lifson, 1951; Cavallini, Tentori et Mondovi, 1950; Zappi, 1954; Taylor et Smith, 1955) stabilisent les acides α -cétoniques urinaires par addition à l'urine d'un acide fort (acide chlorhydrique ou sulfurique), les quantités d'acide préconisées variant considérablement d'un auteur à l'autre. Une telle adjonction n'est cependant pas une méthode de choix pour nos expériences car l'acide minéral ajouté gêne la chromatographie sur papier des acides non cétoniques, qui est réalisée sur les mêmes échantillons d'urine.

C'est pourquoi nous avons étudié la stabilisation par l'acide éthylmercurithiosalicylique (Fabiani et Eberhard, 1951) qui, aux concentrations utilisées, n'interfère avec aucune des techniques que nous effectuons sur l'urine.

Nous avons utilisé, dans ce but, une urine fraîchement émise à laquelle nous avons ajouté un standard d'acide α -cétoglutarique (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ d'urine) et dosé l' α -cétoglutarate, d'une part sur l'urine fraîche, d'autre part sur cette même urine conservée pendant des laps de temps variables à 4°C ainsi qu'à la température du laboratoire (environ 22°C). Trois modalités de stabilisation ont été essayées simultanément: adjonction d'acide éthylmercurithiosalicylique (merseptyl) (10 mm^3 d'une solution au 1/1.000ème par cm^3 d'urine), adjonction d'acide sulfurique (25 cm^3 d'acide 2 N par cm^3 d'urine), enfin adjonction de 2,4-dinitrophénylhydrazine (1 cm^3 d'une solution à 0,2% dans l'acide chlorhydrique 2 N par cm^3 d'urine), cette dernière étant destinée à convertir aussitôt les acides α -cétoniques libres en leur 2,4-dinitrophénylhydrazones (tableau 3).

- 43 -
TABLEAU 3.

COMPARAISON DE DIVERSES MODALITES DE STABILISATION DE L'ACIDE
 α -CETOGLUTARIQUE URINAIRE

CONCENTRATION INITIALE (déterminée sur l'urine fraîchement émise,
après adjonction de 100 μg d'acide
 α -cétoglutarique par cm^3 d'urine):

151 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

URINE CONSERVEE:

Durée de conservation	Agent de stabilisation		
	Ac.éthylmercuri- thiosalicylique (a)	Ac. sulfuri- que (b)	2-4 dini- trophényl- hydrazine (c)
I) Conservation à la température ambiante (environ 22°C):			
1 jour	139,0 (92%)	142,5(94,5%)	145,0(96%)
II) Conservation à 4°C:			
1 jour	141,5 (93,5%)	137,0(91%)	129,0(85,5) %
4 jours	136,0 (90%)	138,5(92%)	108,0(71,5) %

Les résultats correspondent à la moyenne de 3 détermi-
nations; ils sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, le chiffre entre paren-
thèses représentant le pourcentage de récupération par rapport
à l'urine fraîche.

(a) 10 mm^3 d'une solution d'ac.éthylmercurithiosalicylique au
1/1.000 ème par cm^3 d'urine.

(b) 25 mm^3 d'acide sulfurique 2 N par cm^3 d'urine

(c) 1 cm^3 d'une solution à 0,2% de 2,4-dinitrophénylhydrazine
dans l'acide chlorhydrique 2 N par cm^3 d'urine.

Les chiffres ont été corrigés en tenant compte de la
dilution due à l'adjonction de l'agent de stabilisation.

Il ressort, de ce tableau, que la stabilisation du taux de l'acide α -cétoglutarique est sensiblement équivalente, que l'on utilise l'acide éthylmercurithiosalicylique ou l'acide sulfurique, ce qui nous a conduits à utiliser le premier, en raison des avantages discutés plus haut. La récupération est supérieure à 90% après 24 heures à la température ambiante et se maintient à ce niveau pendant 4 jours à 4°C. Il serait donc possible de conserver les urines pendant quelques jours à 4°C avant d'effectuer le dosage. Nous avons néanmoins systématiquement évité cette conservation et pratiqué le dosage sur les urines de 24 heures dès qu'elles ont été recueillies. La stabilisation par adjonction de 2,4-dinitrophénylhydrazine s'avère beaucoup plus défectueuse.

Réalisation pratique du dosage de l'acide α -cétoglutarique.

1) Formation des 2,4-dinitrophénylhydrazones.

Le volume d'urine mis en expérience est, en règle, de 2 cm³; il a été réduit à 1 ou même 0,5 cm³ lorsque l'urine était supposée contenir de fortes concentrations d'acides α -cétoniques. Ce volume a été complété à 20 cm³ avec de l'eau bidistillée, puis on a ajouté 2 cm³ d'une solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine à 0,2% dans l'acide chlorhydrique 2 N. Les tubes ont alors été placés pendant 20 minutes dans un bain-marie à 38°C.

2) Extraction des 2-4-dinitrophénylhydrazones.

Les tubes ont été additionnés de 10 cm³ d'acétate d'éthyle, puis agités manuellement et centrifugés. La phase supérieure est alors prélevée aussi complètement que possible à l'aide d'une pipette effilée. On répète l'extraction trois

fois de suite avec 5 cm³ d'acétate d'éthyle, en centrifugeant entre chacune des extractions et en prélevant chaque fois la couche supérieure d'acétate d'éthyle, qui est réunie à la première. On extrait alors quatre fois de suite cette phase acétate d'éthyle avec 2 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 10%, en séparant chaque fois la phase carbonate. Les quatre phases carbonate étant réunies, sont extraites alors par 2 cm³ d'acétate d'éthyle (pour éliminer l'excès de 2,4-dinitrophénylhydrazine). On place alors le tube contenant les hydrazones en solution dans le carbonate de sodium dans un bain-marie glacé, puis l'on ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique concentré (lui-même préalablement refroidi) jusqu'à ce que l'on observe plus de dégagement gazeux. On extrait alors à quatre reprises par 2 cm³ d'acétate d'éthyle. Il faut noter que pour certaines urines particulièrement riches en acides α -cétoniques, il faut multiplier au-delà des chiffres indiqués le nombre des extractions, et ceci tout au long de la technique. Les diverses fractions d'acétate d'éthyle sont alors réunies puis évaporées à sec, sous pression réduite, à 40°C.

3) Chromatographie des 2,4-dinitrophénylhydrazones.

Le résidu sec ainsi obtenu est dissous dans 0,1 à 1 cm³ d'une solution de soude 0,1 N, puis l'on ajoute goutte à goutte un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2 jusqu'à ce que la coloration rouge de la solution d'hydrazones soit remplacée par une coloration franchement jaune. On note le volume total de soude et de tampon phosphate utilisé.

On dépose alors un aliquot de cette solution (0,1 à 0,2 cm³) sur papier Arches 302; le développement est effectué par voie ascendante à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 heures avec la phase solvante butanol (70 vol.) éthanol absolu (10 vol.), eau (20 vol.)

4) Elution et évaluation quantitative des spots.

Le spot le plus proche du point de déposition correspond à la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'acide α -céto-glutarique. Les contours en sont délimités en lumière de Wood, le spot y apparaissant d'un noir sombre. La surface de papier ainsi délimitée est découpée en fines bandelettes puis on l'extrait à trois reprises par 1 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 10%. On centrifuge alors pour éliminer les débris de papier, puis on ajoute 1 cm³ de soude 2 N. L'absorption à 435 m μ est lue 15 minutes plus tard. La concentration en acide α -cétoglutarique est calculée à partir du chiffre lu, en se reportant à une courbe de référence établie à partir de quantités connues d'acide α -cétoglutarique lors de chaque expérience et en tenant compte du volume total de soude et de tampon phosphate utilisé pour la reprise du résidu sec ainsi que du volume déposé sur papier.

e) ANIMAUX .

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des rats mâles de souche Sprague-Dawley, nourris avec le régime semi-synthétique suivant, donné ad libitum : caséine, 18 %; glucose, 73 %; huile d'arachide, 3 %; huile de foie de morue, 2 %; sels; 4 %. Le mélange de sels était composé de chlorure de potassium, 104 g.; carbonate de sodium anhydre, 104 g.; carbonate de magnésium, 35 g.; perchlorure de fer 0,37 g.; iodure de potassium 0,025 g.; lactate de calcium 250 g.; alun de potassium 0,03 g. et citrate de sodium 3,92 g. Les vitamines suivantes ont été ajoutées (pour 100 g. de pâtée) : vitamine B₁ 0,4 mg.; vitamine B₂ 0,5 mg.; vitamine B₆ 0,4 mg.; nicotinamide 2 mg.; pantho-
thénate de calcium 2 mg.

Les rats ont été placés dans des cages métaboliques permettant la récolte des urines non souillées par les matières. Les récipients destinés à la récolte des urines de 24 heures contenaient 0,3 cm³ d'une solution au 1/1.000 d'acide éthylmercurithiosalicylique (merseptyl). Cet antiseptique, préconisé par Fabiani et Eberhard (1951) a été adopté de préférence aux acides minéraux en raison de la gêne apportée par ces acides

lors de la chromatographie des acides organiques urinaires. Nous rapporterons à propos du dosage de l'acide α -cétoglutarique les expériences que nous avons entreprises pour nous assurer de l'efficacité de l'acide éthylmercurethiosalicylique.

Les injections de substrats ont été faites par voie intrapéritonéale et sans que les animaux aient été anesthésiés ou soumis à un jeûne préalable. Sauf pour le trans-aconitate, la quantité de substrat injecté était de 200 Moles/100 g. de poids.

Pour les études des acides tissulaires, les animaux ont été sacrifiés par décapitation après qu'on leur eût administré un coup violent sur la région céphalique (de façon à éviter la nécessité d'une anesthésie susceptible de modifier la concentration tissulaire des acides du cycle tri-carboxylique). Le foie et les reins ont été aussitôt prélevés, pesés et lavés dans une solution isotonique de chlorure de potassium préalablement refroidie entre 0 et 4° C. Après décapsulation des reins, foie et reins ont été passés sous pression à travers un tamis (type seringue métallique) pour éliminer l'essentiel

du conjonctif, puis homogénéisés aussitôt pendant 1 minute dans un appareil de Potter-Elvehjem. Le chlorure de potassium isotonique (4 cm³ par g. de tissu frais) a été choisi comme milieu d'homogénéisation de préférence au saccharose en raison de l'interférence causée par cet ose lors du dosage de l'acide citrique.

L'ensemble de ces opérations a été effectué le plus rapidement possible et en maintenant tout au long une température comprise entre 0 et +4° C. pour prévenir les variations autolytiques de la concentration des acides du cycle citrique. L'homogénéisation a toujours été entreprise en réunissant les organes de trois animaux, de façon à disposer de suffisamment d'homogénat pour les divers dosages entrepris.

- - - - -

C) INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS.

Nous avons choisi, comme mode d'expression des résultats, la moyenne arithmétique $\pm$ l'intervalle de confiance au risque de 5% pour la moyenne observée, soit 2.6, 6 étant calculé par la formule $\sqrt{\frac{\sum (x-M)^2}{N-1}}$

Le caractère significatif ou non, de différences entre deux moyennes, a été déterminé par la formule:

$$t = \frac{M_A - M_B}{\sqrt{\frac{s_A^2}{N_A} + \frac{s_B^2}{N_B}}}$$

$$s^2 \text{ étant égal à } \frac{f_A + f_B}{(N_A - 1) + (N_B - 1)}$$

(M_A : moyenne arithmétique observée pour la série A; M_B : idem pour la série B; N_A et N_B : nombre d'animaux des séries A et B; f_A et f_B : carré de la somme des différences entre chacun des résultats et la moyenne observée, soit $\sum (x_A - M_A)^2$ et $\sum (x_B - M_B)^2$. On compare le t calculé à la valeur trouvée sur la table de distribution de t pour le nombre $n = N_A + N_B - 2$.

(Nous remercions vivement Monsieur Daniel SCHWARTZ des conseils qu'il a bien voulu nous donner pour l'interprétation et l'expression statistiques des résultats).

R E S U L T A T S

E X P E R I M E N T A U X .

Les techniques décrites précédemment ont été utilisées pour l'étude du métabolisme des acides dicarboxyliques du cycle de Krebs chez le rat.

I

ETUDES PORTANT SUR LES ACIDES DU CYCLE CITRIQUE DE L'URINE

Nous avons tout d'abord considéré les modifications de la concentration urinaire des acides du cycle tricarboxylique déterminées par l'injection des acides dicarboxyliques. Pour préciser le mécanisme des modifications constatées, nous avons été conduits à envisager de même les modifications urinaires déterminées par l'injection de pyruvate ainsi que de trans-aconitate, seuls et associés au malate.

Il eût été intéressant de doser parallèlement les acides du cycle citrique dans le plasma sanguin. Nous y avons cependant renoncé en raison de la concentration extrêmement faible de ces acides, ne permettant pas leur détermination sur la petite quantité de sang dont nous disposions.

Frohman, Orten et Smith (1951 a) n'ont, en effet, pu mettre en évidence de pics nets correspondants aux acides aconitique, isocitrique, α -cétoglutarique, succinique, malique et oxaloacétique lors de leurs expériences de chromatographie du sang de rat sur gel de silice et ont conclu de ce résultat négatif que la concentration de ces divers acides y est inférieure à $1 \mu \text{ g./cm}^3$.

A) ELIMINATION URINAIRE "BASALE" DES ACIDES DU CYCLE CITRIQUE.

Pour saisir les modifications de concentration des acides du cycle tricarboxylique dans l'urine lors de l'injection des acides dicarboxyliques, nous avons tout d'abord déterminé leur concentration "basale" dans l'urine normale. Nous entendons par "basale" l'élimination urinaire correspondant au régime semi-synthétique utilisé, en dehors de toute "charge", c'est-à-dire sans injection de métabolites.

Dans ces conditions, la citraturie est en moyenne de $7,2 \pm 1,9 \mu\text{Mol.}/24 \text{ h.}$, tandis que l'élimination d' α -cétoglutarate est de $4,0 \pm 0,8 \mu\text{Mol.}/24 \text{ h.}$ (tableau 4).

Il faut remarquer que ces chiffres dépendent étroitement du régime. Nous avons constaté, en effet, que l'élimination de ces deux acides est environ deux fois plus élevée lorsque les rats, avant d'être utilisés pour l'expérimentation, recevaient un régime mixte non contrôlé riche en carottes et en légumes verts.

Lorsque l'on remplace ce régime par la pâtée semi-synthétique décrite précédemment, la citraturie s'abaisse pour se stabiliser entre 4 et $12 \mu\text{Mol.}/24 \text{ h.}$ à partir du deuxième, troisième jour, et jusqu'au quinzième jour.

- 54 -
TABLEAU 4.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE

CHEZ LE RAT NORMAL EN L'ABSENCE DE TOUTE CHARGE.

(Résultats en μ Mol./24 heures).

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	11,0	6,5
2	5,9	4,7
3	5,4	5,3
4	5,4	3,2
5	6,5	3,4
6	5,4	1,5
7	10,8	4,6
8	3,4	2,0
9	11,8	5,5
10	5,7	4,3
11	4,4	2,5
12	4,7	3,7
13	11,8	5,1
14	8,9	-
MOYENNE	7,2	4,0
$\sqrt{\frac{\sigma^2}{N}}$	1,9	0,8

Si l'on poursuivait le régime au delà d'une période de quinze jours, on ne saurait exclure la possibilité d'une carence en certains éléments non ajoutés au régime, en particulier en choline, inositol et vitamine B₁₂.

Ces considérations nous ont conduits à n'utiliser pour les expériences de charge que des rats soumis au régime semi-synthétique depuis plus de trois jours et moins de quinze jours.

L'influence capitale de l'alimentation apparaît encore lorsque l'on soumet au jeûne des animaux précédemment nourris avec le régime semi-synthétique utilisé au cours de ces expériences.

On constate, en effet, que l'élimination de citrate aussi bien que celle d' α -cétoglutarate diminuent rapidement dans ces conditions (tableau 5).

La citraturie (exprimée en μ Mol./24 h.), qui est de $7,2 \pm 1,9$ chez les animaux nourris, s'abaisse ainsi à $6,4 \pm 3,2$ après 24 h. de jeûne, puis à $2,0 \pm 0,8$ si l'on poursuit le jeûne pendant quarante-huit heures, enfin à $2,6 \pm 0,6$ après un jeûne de soixante-douze heures.

- 56 -
TABLEAU 5.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
DE RATS SOUMIS A DES PERIODES DE JEUNE DE DUREE VARIABLE.

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Durée du jeûne</u>	<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
24 h.	1	4,5	3,6
	2	6,3	3,2
	3	5,0	2,6
	4	13,0	3,6
	5	3,2	1,1
		-----	-----
	MOYENNE	6,4	2,8
	$\frac{205}{\sqrt{N}}$	3,2	1,0
48 h.	1	2,4	2,1
	2	1,4	1,0
	3	1,3	0,5
	4	3,4	2,9
	5	1,3	1,0
		-----	-----
	MOYENNE	2,0	1,5
	$\frac{25}{\sqrt{N}}$	0,8	0,9
72 h.	1	3,2	1,4
	2	2,1	1,0
	3	3,5	1,7
	4	1,7	0,7
	5	2,7	1,3
		-----	-----
	MOYENNE	2,6	1,2
	$\frac{25}{\sqrt{N}}$	0,6	0,4

Les chiffres correspondant pour l' α -cétoglutarate (dont l'élimination "basale" est de $4,0 \pm 0,8$) sont respectivement $2,8 \pm 1,0$; $1,5 \pm 0,9$; $1,2 \pm 0,4$.

La relation étroite entre citraturie et régime a déjà été soulignée par divers auteurs (Kuyper et Mattill, 1933 ; Boothby et Adams, 1934 ; Sherman, Mendel et Smith, 1936 ; Meyer et Smith, 1940).

Une telle relation n'avait cependant pas été trouvée pour l' α -cétoglutarate serait peu influencée par l'alimentation. Nos constatations sont donc en contradiction avec celles de cet auteur.

En raison de la faible concentration des acides aconitique, succinique, fumarique et malique dans l'urine normale, nous n'avons pu déterminer avec suffisamment de précision leur élimination "basale".

Notons cependant que les spots des acides succinique et malique sont quasi-constants sur les chromatogrammes des acides organiques urinaires lorsque l'on applique la technique décrite précédemment à un volume d'urine contenant 2 mg. de créatinine.

La présence d'acide succinique dans l'urine du rat normal avait été signalée par Krebs, Salvin et Johnson (1938) tandis que nous-même, dans un travail en collaboration avec J. Nordmann, O. Gauchery, J.P. du Ruisseau et Y. Thomas (1954 a), avons décelé l'acide malique dans l'urine humaine normale.

La tache d'acide fumarique est beaucoup plus inconstante sur les chromatogrammes urinaires des rats normaux. Quant à l'acide aconitique, sa tache n'est pas visible lorsqu'on révèle simplement ces chromatogrammes par un indicateur de pH, mais elle apparait en rose lorsqu'on utilise la révélation par le p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'anhydride acétique, qui est beaucoup plus sensible (limite de sensibilité : environ 1 μ g.).

B) MODIFICATIONS DE L'ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES DU CYCLE CITRIQUE
DETERMINEES PAR L'ADMINISTRATION D'ACIDES DICARBOXYLIQUES

Ayant ainsi considéré l'élimination "basale" des acides du cycle citrique, nous avons étudié les modifications de cette élimination déterminées par l'injection des acides dicarboxyliques (α -cétoglutarique, succinique, fumarique, l- et dl-malique) administrés par voie intrapéritonéale (après neutralisation à pH 7,4) à raison de 200 μ Moles/100 g. de poids.

Les chromatogrammes des acides organiques de l'urine des 24 heures suivant ces diverses injections montrent une augmentation sélective des acides du cycle tricarboxylique, analogue à celle constatée après perfusion de succinate chez l'homme au cours d'un travail antérieur, réalisé en collaboration avec J. Nordmann, A. Marty et J.P. du Ruisseau (1955).

Les acides étant injectés sous forme de sels de sodium, une action alcalinisante pourrait résulter du fait que le cation est fixe, tandis que l'anion est métabolisable.

L'augmentation des acides du cycle citrique dans l'urine ne peut cependant pas être attribuée à une telle action alcalinisante, d'une part en raison de sa sélectivité (les autres acides organiques ne sont pas modifiés de façon significative)

d'autre part à cause de l'absence de modifications analogues lors de l'injection de quantités équinormales de bicarbonate de sodium.

Dans les tableaux qui suivent, ayant trait à l'élimination des acides du cycle citrique après injection des acides dicarboxyliques, nous n'avons fait figurer que les résultats concernant les acides citrique, α -cétoglutarique, succinique et malique. En effet, l'augmentation de l'élimination des acides aconitique et fumarique à la suite de ces injections est trop discrète pour que leur dosage par chromatographie quantitative sur papier ne soit pas entaché d'une trop grande incertitude.

L'influence de l'injection de succinate, l-malate et dl-malate sur l'élimination urinaire des acides citrique, α -cétoglutarique, succinique et malique a été étudiée sur un nombre de rats variant entre 10 et 17.

Ne disposant que d'une quantité limitée d' α -cétoglutarate, nous n'avons pu, par contre, étudier l'action de l'injection d' α -cétoglutarate que chez cinq animaux. Nous n'envisagerons pas les résultats des injections de fumarate, que nous n'avons réalisées jusqu'ici que chez trois rats.

Ce nombre est, en effet, insuffisant pour permettre des conclusions statistiquement valables, en raison de la variabilité individuelle d'animal à animal que nous avons constatée bien que les rats fussent de souche, sexe et poids identiques et que le régime fût standardisé.

Katz et Chaikoff (1955) ont noté de même, au cours d'expériences sur l'utilisation de l'acétate chez le rat, l'impossibilité d'obtenir des résultats uniformes même en standardisant au maximum les conditions expérimentales.

1) CHARGES EN α -CETOGLUTARATE.

Les modifications urinaires obtenues lors de l'injection d' α -cétoglutarate sont consignées dans le tableau 6.

Après injection d' α -cétoglutarate à raison de 200 μ Moles/100 g. de poids, l'élimination urinaire d' α -cétoglutarate s'élève à $91,2 \pm 28,2 \mu$ Moles/24 h. au lieu de $4,0 \pm 0,8$ avant l'injection. Le poids moyen des rats étant de 270 g., la fraction de l'acide injecté retrouvée dans l'urine est de $17,0 \pm 5,2 \%$.

L'élimination de chacun des acides succinique et malique atteint environ 23 μ Moles/24 h., celle de l'acide citrique $52,5 \pm 8,0$.

TABLEAU 6.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE, α -CETOGLUTARIQUE,
SUCCINIQUE & MALIQUE AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION
INTRAPERITONEALE D' α -CETOGLUTARATE DE SODIUM (200)

(μ Moles/100 g. de poids)

Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	59	120
2	40	53
3	46	73
4	61	126
5	55	84
	-----	-----
MOYENNE	52,5	91,2
$\frac{2 \sigma}{\sqrt{N}}$	8,0	28,2

<u>Rat no.</u>	<u>Acide succinique</u>	<u>Acide malique</u>
1	26	23
2	16	19
3	17	24
4	26	22
5	30	29
	-----	-----
MOYENNE	23,0	23,4
$\frac{2 \sigma}{\sqrt{N}}$	5,5	3,2

2) CHARGES EN SUCCINATE.

L'élimination urinaire des acides succinique, malique, citrique et α -cétoglutarique est respectivement de $53,6 \pm 11,5$; $25,1 \pm 5,1$; $45,0 \pm 4,9$ et $36,2 \pm 5,4$ μ Moles au cours des 24 heures suivant l'administration de succinate (tableaux 7 et 8).

Si l'on compare ces résultats avec ceux trouvés après injection d' α -cétoglutarate, on constate tout d'abord que le pourcentage de l'acide injecté retrouvé dans l'urine est notablement plus faible après injection de succinate qu'après administration d' α -cétoglutarate; il n'atteint en effet que $9,9 \pm 2,1$ %, au lieu de $17,0 \pm 5,2$ %. Ce haut degré de métabolisation du succinate peut être interprété comme le témoin de la forte activité des systèmes enzymatiques ayant le succinate pour substrat.

La comparaison de l'élimination des acides autres que l'acide injecté respectivement après charge en α -cétoglutarate et en succinate révèle une différence essentielle.

L'élimination de citrate est, en effet, plus faible après injection de succinate qu'après administration d' α -cétoglutarate (respectivement

- 64 -
TABLEAU 7.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE
DE SUCCINATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G.DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	39	35
2	51	48
3	35	27
4	48	44
5	58	45
6	39	37
7	51	41
8	31	24
9	35	33
10	42	38
11	28	-
	-----	-----
MOYENNE	41,5	37,2
$\frac{2. \sigma}{\sqrt{N}}$	1,8	4',9

TABLEAU 2.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES SUCCINIQUE ET MALIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITO-
NEALE DE SUCCINATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS)
(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

Rat no. ---	Acide succinique -----	Acide malique -----
1	59	19
2	68	34
3	62	33
4	56	30
5	74	38
6	35	17
7	43	21
8	78	24
9	36	17
10	25	18
	-----	-----
MOYENNE	53,6	25,1
$\frac{26}{\sqrt{N}}$	11,5	5,1

36,2 $\pm$ 5,4 et 52,5 $\pm$ 8,0 (μ Moles/24 h.), et ceci bien que l'élimination de malate ne soit pas significativement différente dans les deux cas.

Il en résulte que le rapport $\frac{\text{malate}}{\text{citrate}}$ est plus faible (0,44) par élévation du dénominateur après injection d' α -cétoglutarate que de succinate (0,60).

La plus forte élimination de citrate lors des charges en α -cétoglutarate peut être due soit à une réduction du catabolisme de l'acide citrique due à l'importante accumulation d' α -cétoglutarate, soit à la formation de citrate à partir de l' α -cétoglutarate par les réactions :



3) CHARGES EN MALATE.

L'administration de malade pose un problème particulier du fait de l'existence de deux isomères (l- et d-), dont seul l'isomère l- est physiologique.

- 67 -
TABLERAU 9.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONNEALE
DE L-MALATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G.DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	30	17
2	45	37
3	37	26
4	53	27
5	47	33
6	49	38
7	45	42
8	38	32
9	32	22
10	50	42
11	64	45
12	56	55
13	42	36
14	57	54
15	48	44
16	27	21
17	-	44
MOYENNE	45,0	36,2
$\frac{2 \cdot 6}{\sqrt{N}}$	4,9	5,4

- 68 -
TABLEAU 10.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES SUCCINIQUE & MALIQUE AU
COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE
DE L-MALATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 g.DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide succinique</u>	<u>Acide malique</u>
1	9	17
2	31	40
3	17	21
4	27	27
5	17	22
6	24	24
7	29	36
8	19	19
9	17	25
10	34	62
11	16	38
12	29	52
13	-	26
14	-	62
MOYENNE	22,3	33,7
$\frac{26}{\sqrt{N}}$	4,4	9,6

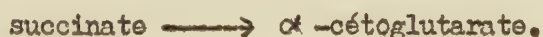
a) Charges en l-malate.

Nous avons tout d'abord étudié les modifications urinaires déterminées par l'injection de l-malate (tableaux 9 et 10).

On retrouve dans l'urine des 24 heures suivant cette injection $33,7 \pm 9,6$ μ Moles, soit $6,3 \pm 1,8$ % de la quantité injectée.

La quantité d'acide citrique éliminée n'est pas statistiquement différente (au risque de 5 %), de celle excrétée après injection de succinate (respectivement $45,0 \pm 4,9$ et $41,5 \pm 1,8$ μ Moles/24 h.); il en est de même de celle d' α -cétoglutarate (respectivement $36,2 \pm 5,4$ et $37,2 \pm 4,9$).

L'élimination de succinate étant significativement plus faible lors des charges en l-malate que lors de celles en succinate (respectivement $22,3 \pm 4,4$ et $53,6 \pm 11,5$ Moles/24 h.), on peut en conclure que l' α -cétoglutarate n'est pas formé de façon appréciable par la réaction



b) Charges en d-malate.

Le problème du comportement in vivo de l'isomère d-malate était intéressant à considérer en l'absence de documents à ce sujet dans la littérature.

Théoriquement cet isomère pourrait soit être métabolisé (sous l'influence d'un système enzymatique hypothétique actif sur l'isomère d-), soit être éliminé sans retentir sur le déroulement du cycle citrique ou encore en agissant en tant qu'inhibiteur compétitif des enzymes actifs sur l'isomère l-.

Faute de disposer de l'isomère d- isolé, nous avons injecté du dl-malate; les modifications urinaires consécutives à ces injections sont consignées dans les tableaux 11 et 12.

On constate que l'élimination urinaire de malate est beaucoup plus importante après injection de dl-malate qu'après administration de l-malate ($168,0 \pm 18,8 \mu\text{Moles}/24 \text{ h.}$ au lieu de $33,7 \pm 9,6$). Une grande partie de l'isomère d- est donc éliminée par voie urinaire; cette élimination est cependant inférieure à la totalité de l'isomère d- injecté (puisque'elle ne représente que $31,0 \pm 1,8 \%$ du dl-malate injecté). La quantité de d-malate non retrouvée dans l'urine pourrait soit être éliminée par une autre voie, soit être métabolisée.

TABIEAU 11.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE
DE DL-MALATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G.DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	62	54
2	51	32
3	42	24
4	36	26
5	62	42
6	50	23
7	42	27
8	40	29
9	34	25
10	52	26
11	46	24
12	44	18
13	57	39
14	56	28
15	54	25
16	48	20
17	54	21
	-----	-----
MOYENNE	48,8	28,3
$\frac{26}{\sqrt{N}}$	4,1	3,3

- 72 -
TABLEAU 12.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES SUCCINIQUE & MALIQUE AU COURS
DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE
DL-MALATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G.DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide succinique</u>	<u>Acide malique</u>
1	45	222
2	35	150
3	16	178
4	18	101
5	39	220
6	17	143
7	22	205
8	27	196
9	28	172
10	14	150
11	12	149
12	21	164
13	-	125
14	-	134
15	-	207
MOYENNE	24,4	168,0
$\frac{2}{6}$	6,5	18,8
$\sqrt{N}$		

L'élimination urinaire de citrate n'est pas significativement différente (au risque de 5 %) lors de l'injection de l- et de dl-malate (respectivement $45,0 \pm 4,9$ et $48,8 \pm 4,1$ μ Moles/24 h.).

Cette constatation paraît d'autant plus surprenante qu'il n'en est pas de même pour l'élimination d' α -cétoglutarate, qui, elle, est plus faible après injection d'une quantité équimoléculaire de dl-malate que de l-malate (respectivement $28,3 \pm 3,3$ et $36,2 \pm 5,4$ μ Moles/24 h.), la différence étant significative au risque de 5 %.

Le rapport $\frac{\text{citrate}}{\alpha\text{-cétoglutarate}}$ est ainsi notablement différent après injection de l- et de dl-malate, soit respectivement 1,24 et 1,73.

La différence apparaît encore plus considérable si l'on considère non pas l'urine des 24 heures suivant l'injection de l- ou dl-malate, mais l'urine recueillie plus précocement après cette injection (tableau 13). On constate que ce rapport dans l'urine recueillie trois heures après administration d'une quantité identique de l- ou de dl-malate est respectivement de 0,96 et 1,86, la différence étant hautement significative au risque de 5 %.

- 74 -
TABIEAU 13.

CITRATE
RAPPORTE ----- DANS LES URINES REQUEILLIES TROIS
 α -CETOGLUTARATE
HEURES APRES INJECTION DE L- OU DL-MALATE (200 μ MOLES/100 G.
DE POIDS).

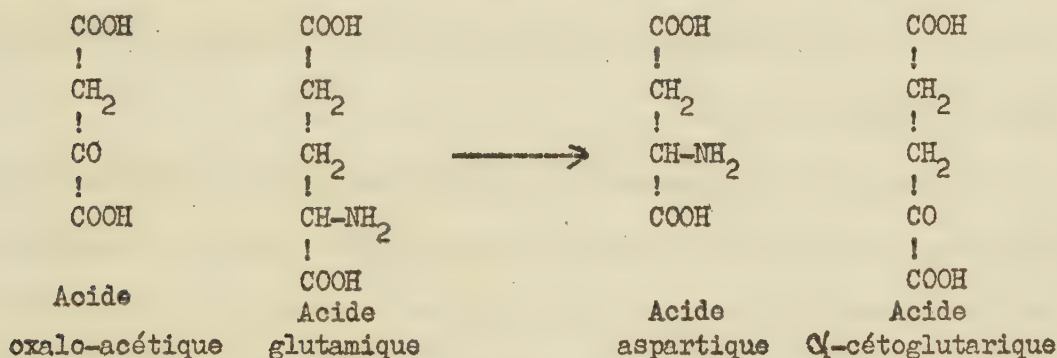
Substrat injecté

Elimination
(en μ Mol./cm³)

	<u>Citrate</u>	<u>α-cétoglutarate</u>	<u>Rapport</u> <u>$\frac{\text{Citr.}}{\alpha\text{-cét.}}$</u>
L-MALATE	21,4	17,2	1,24
	13,7	17,7	0,77
	28,0	22,7	1,23
	17,5	20,5	0,85
	12,1	16,9	0,71
		MOYENNE	0,96
		<u>2 σ</u>	0,23
		$\sqrt{N}$	
DL-MALATE	25,5	17,1	1,50
	9,4	5,7	1,64
	24,5	10,4	2,35
	11,0	6,8	1,61
	21,8	10,0	2,18
		MOYENNE	1,86
		<u>2 σ</u>	0,33
		$\sqrt{N}$	

Il apparaît donc qu'une partie de l' α -cétoglutarate éliminé après injection de l-malate doit se former par un processus différent du cycle citrique et qui est représenté apparemment par la transamination avec le glutamate d'une fraction de l'oxaloacétate résultant de l'administration de l-malate.

Une telle transamination fournit, en effet, de l' α -cétoglutarate à partir de l'oxaloacétate sans passer par le stade citrique selon la réaction :



En rapprochant ces résultats de l'effet de l'administration de succinate sur la citraturie, on constate que l'élimination de citrate est identique que l'on injecte du succinate, du l-malate ou encore du dl-malate.

Le pourcentage de l'acide injecté retrouvé dans l'urine et échappant donc au métabolisme est cependant lui-même très différent dans les trois cas, puisqu'il est considérablement plus faible dans le cas du succinate ou du l-malate que dans celui du dl-malate. Bien que le degré plus intense de métabolisation du succinate et du l-malate doive entraîner la formation de plus d'oxaloacétate, l'élimination de citrate ne s'en trouve pas accrue.

Il existe donc un freinage du cycle citrique au niveau de la condensation oxaloacétate - acétylcoenzyme A.

Ce freinage ne retentit pas sur l' α -cétoglutarate, dont l'élimination est plus importante après injection d'acides dicarboxyliques fortement métabolisés qu'après celle de dl-malate, cet excès d' α -cétoglutarate devant alors se former non par l'intermédiaire du cycle citrique, mais par transamination d'une partie de l'oxaloacétate.

Il est logique de penser que le freinage de la condensation oxaloacétate - acétylcoenzyme A mis en évidence dans les cas où se forment des quantités importantes d'oxaloacétate est en rapport avec un manque d'acétylcoenzyme A disponible.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'influence de l'injection de pyruvate, source d'acétyl-coenzyme A, sur les modifications urinaires observées.

4) CHARGES COMPORTANT L'ADMINISTRATION DE PYRUVATE

a) Charges en pyruvate sans administration parallèle d'acides dicarboxyliques

L'élimination urinaire de citrate s'élève à peine après injection de pyruvate (tableau 14). La citraturie atteint, en effet, $8,2 \pm 3,6$ μ Moles/24 h. après une telle injection au lieu de $7,2 \pm 1,9$ pour les animaux témoins, la différence n'étant pas significative au risque de 5 %.

L'élimination d' α -cétoglutarate, par contre, augmente de façon significative, quoique discrète ($6,7 \pm 1,8$ Moles/24 h.; après pyruvate: $4,0 \pm 0,8$ chez les animaux témoins). Celle des autres acides du cycle citrique ne se modifie pas sensiblement après administration de pyruvate.

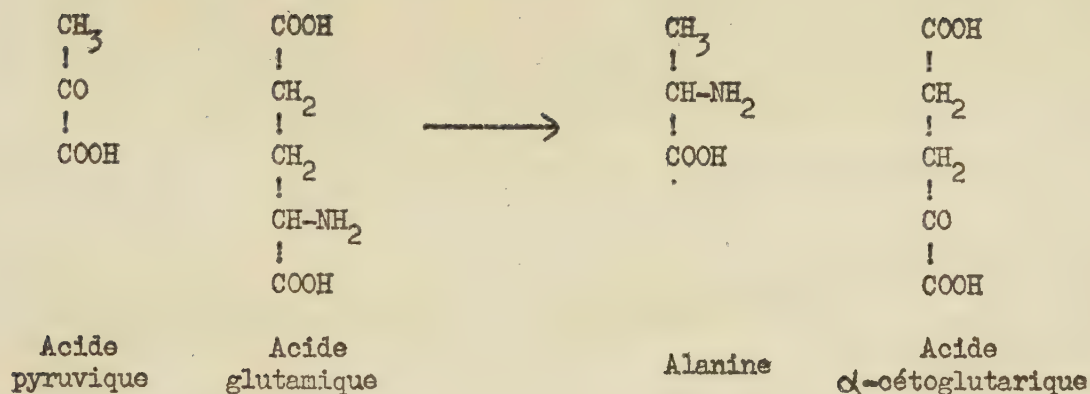
On observe donc après injection de pyruvate, comme lors des charges en succinate ou en l-malate, une élévation plus marquée de l'élimination d' α -cétoglutarate que de citrate. On peut incriminer ici encore une réaction de transamination, le pyruvate réagissant avec le glutamate pour former de l'alanine et de l' α -cétoglutarate selon la réaction :

- 78 -
TABLEAU 14.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE
DE PYRUVATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	5	6
2	3	5
3	14	9
4	4	4
5	3	3
6	18	10
7	3	6
8	15	12
9	7	5
10	10	7
	-----	-----
MOYENNE	8,2	6,7
<u>26</u>	3,6	1,8
$\sqrt{N}$		



Notons que Busch (1955) avait déjà constaté que l'essentiel du pyruvate administré au rat est métabolisé par l'intermédiaire des processus de transamination et de réduction en lactate, et non par le cycle citrique.

b) Administration simultanée de pyruvate et de dl-malate

Les résultats que nous venons d'envisager permettent de conclure que le métabolisme s'effectue pour une large part par une voie autre que le cycle citrique aussi bien lors des charges en pyruvate que lors de celles en succinate ou en malate. Le freinage s'exerce toujours au niveau de la condensation oxaloacétate-

- 80 -
TABLEAU 15.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE & α -CETOGLUTARIQUE
AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE
SIMULTANEE DE PYRUVATE (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS) & DE
DL-MALATE DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide α-cétoglutarique</u>
1	71	32
2	77	41
3	48	25
4	75	38
5	68	40
6	83	41
7	121	54
8	99	37
9	73	-
	-----	-----
MOYENNE	79,3	38,6
$\frac{2\sigma}{\sqrt{N}}$	13,6	5,7

- 81 -
TABLEAU 16.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES SUCCINIQUE & MALIQUE AU COURS
DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE SIMULTANEE
DE PYRUVATE (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS) & DE DL-MALATE DE
SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide succinique</u>	<u>Acide malique</u>
1	26	145
2	43	195
3	28	122
4	43	218
5	39	209
6	46	161
7	51	183
8	25	152
9	22	-
MOYENNE	36,0	173,1
$\frac{266}{\sqrt{N}}$	7,1	24,0

acétylcoenzyme A et semble conditionné par un manque d'oxaloacétate lors des charges en pyruvate et un manque en acétylcoenzyme A lors de l'injection d'acides dicarboxyliques.

S'il en est bien ainsi, l'administration simultanée d'une source d'oxaloacétate (malate) et d'une source d'acétylcoenzyme A (pyruvate) doit faciliter le passage par le cycle citrique et déterminer un accroissement de la citraturie supérieur à celui noté lors de l'injection isolée de ces substrats.

Nous avons constaté, en effet, qu'après injection simultanée de pyruvate et de dl-malate (tableaux 15 et 16), la citraturie dépasse de façon significative la somme des citraturies trouvées après injection isolée de pyruvate et de dl-malate ($79,3 \pm 13,6$ μ Moles/24 h. au lieu de $8,2 \pm 3,6$ après injection de pyruvate et $48,8 \pm 4,1$ après injection de dl-malate).

L'élimination d' -cétoglutarate ($38,6 \pm 5,7$ μ Moles/24 h.), par contre, n'est pas significativement plus élevée que la somme des éliminations trouvées après injection de pyruvate ($6,7 \pm 1,8$) et de dl-malate ($28,3 \pm 3,3$). De même, l'élimination de malate n'est pas significativement différente après injection de dl-malate + pyruvate ($173,1 \pm 24,0$ μ Moles/24 h) et de dl-malate seul ($168,0 \pm 18,8$).

TABLEAU 17.

CARACTERE SIGNIFICATIF (AU RISQUE DE 5%) DES DIFFERENCES
D'ELIMINATION D'ACIDE CITRIQUE DANS L'URINE DES 24 HEURES
SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE DIVERS SUBSTRATS

(200 μ Moles/100 g. de poids, sauf pour le trans-aconitate)

SUBSTRAT INJECTE -----	CITRATURIE (en μ Moles/ 24 h.) -----	CARACTERE SIGNIFI- CATIF DE LA DIFFERENCE -----
NEANT	7,2 $\pm$ 1,9	
PYRUVATE	8,2 $\pm$ 3,6	
TRANS-ACONITATE (100 μ Mol/ 100 g.)	27,7 $\pm$ 2,1	
α -CETOGLUTARATE	52,5 $\pm$ 8,0	+
SUCCINATE	41,5 $\pm$ 1,8	-
L-MALATE	45,0 $\pm$ 4,9	-
DL-MALATE	48,8 $\pm$ 4,1	+
DL-MALATE + PYRUVATE	79,3 $\pm$ 13,6	-
DL-MALATE + PYRUVATE + TRANS-ACONITATE (100 μ Moles/100 g.)	77,6 $\pm$ 13,7	

- 84 -
TABLEAU 18.

CARACTERE SIGNIFICATIF (AU RISQUE DE 5%) DES DIFFERENCES
D'ELIMINATION D' α -CETOGLUTARATE DANS L'URINE DES 24 HEURES
SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE DIVERS SUBSTRATS
 (200 μ Moles/100 g. de poids, sauf pour le trans-aconitate)

SUBSTRAT INJECTE	ELIMINATION URINAIRE D' α -CETOGLUTARATE (en μ Moles/24 h.)	CARACTERE SIGNIFI- CATIF DE LA DIFFERENCE
-----	-----	-----
NEANT	4,0 $\pm$ 0,8	
PYRUVATE	6,7 $\pm$ 1,8	+
α -CETOGLUTARATE	91,2 $\pm$ 28,2	+
SUCCINATE	37,2 $\pm$ 4,9	+
L-MALATE	36,2 $\pm$ 5,4	-
DL-MALATE	28,3 $\pm$ 3,3	+
DL-MALATE + PYRUVATE	38,6 $\pm$ 5,7	+
DL-MALATE + PYRUVATE + TRANS-ACONITATE (100 μ Moles/100 g.)	43,0 $\pm$ 11,3	-

Le fait d'associer pyruvate et malate n'influe donc pas sur le pourcentage métabolisé, mais augmente la fraction empruntant le cycle citrique aux dépens de celle passant par la voie de la transamination.

5) UTILISATION D'INHIBITEURS DU CYCLE CITRIQUE

Pour différencier nettement ces deux fractions, il apparaissait utile d'étudier les modifications déterminées par l'injection simultanée d'un inhibiteur spécifique du cycle citrique agissant entre les stades citrique et α -cétoglutarique. Les inhibiteurs de l'aconitase semblaient devoir permettre l'inhibition sélective des réactions du cycle tricarboxylique au niveau de cet enzyme.

On dispose de trois groupes essentiels d'inhibiteurs de l'aconitase : le fluoroacétate qui agit après transformation en fluorocitrate (Liébecq et Peters, 1949; Martius, 1949; Buffa, Peters et Wakelin, 1951), le trans-aconitate, isomère non physiologique agissant par compétition avec le cis-aconitate (Saffran et Prado, 1948 et 1949; Weinhouse, Millington et Wenner, 1951), enfin les inhibiteurs agissant sur l'ion ferreux nécessaire à l'activité de l'aconitase, α - α' -dipyridyle.

o-phénanthroline (Takeda et Hara, 1955 ; Herr, Sumner et Yesair, 1956).

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons eu recours à l'injection de fluoroacétate de sodium, à raison de 0,5 mg./100 g. de poids par voie intrapéritonéale, dose qui est celle utilisée par Buffa et Peters (1950), Potter et Busch (1950), Lindenbaum, White et Schubert (1951). En raison de la toxicité du fluoroacétate à cette dose, nous avons réduit secondairement la quantité de fluoroacétate injectée à 0,2 mg./100 g. de poids; il s'est avéré cependant que, même dans ces conditions, le fluoroacétate entraîne des lésions rénales déterminant une réduction considérable de la diurèse et rendant illusoire les dosages sur l'urine. L'examen anatomo-pathologique montre des images de néphrite congestive les glomérules étant bourrés d'hématies, les capillaires dilatés et les tubuli ayant une lumière souvent obstruée par des cellules de revêtement boursoufflées.

Nous n'avons pas poursuivi de ce fait les essais avec le fluoroacétate. Les inhibiteurs du type α - α' -di-pyridyle ou o-phénanthroline présentant l'inconvénient de ne pas être spécifiques de l'aconitase car ils agissent sur tous les enzymes pour l'activité desquels l'ion ferreux est nécessaire,

nous n'avons pas eu recours à eux, mais au trans-aconitate pour tenter d'inhiber l'aconitase sans déterminer de lésions rénales.

Le trans-aconitate n'a été utilisé jusqu'ici en tant qu'inhibiteur du cycle tricarboxylique qu'au cours d'expériences in vitro (Saffran et Prado, 1948 et 1949; Weinhouse, Millington et Wenner, 1950 et 1951; Felts et Osborne, expériences non publiées citées par Katz et Chaikoff, 1955).

La question se posait de savoir si l'injection de cet isomère non physiologique ne déterminerait pas de phénomènes toxiques et si elle se traduirait effectivement par une inhibition de l'aconitase.

A la dose de $100 \mu\text{Moles}/100 \text{ g. de poids}$, nous n'avons noté aucun signe de toxicité et, en particulier, aucune réduction de la diurèse. La citraturie s'élève de façon constante dans l'urine des 24 heures suivant une telle injection; elle atteint $27,7 \pm 2,1 \mu\text{Moles}/24 \text{ h.}$ (tableau 19).

Une telle élévation de la citraturie pourrait être due au métabolisme d'une partie du trans-aconitate après isomérisation en cis-aconitate.

Weinhouse, Millington et Wenner (1951) ont

TABLEAU 19.

ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE CITRIQUE AU COURS DES 24 HEURES
SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE TRANS--ACONITATE DE

SODIUM

(100 μ MOLES/100 G. DE POIDS)

Résultats exprimés en μ Moles/24h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>
1	33
2	21
3	22
4	34
5	18
6	22
7	12
8	35
9	33
10	47

MOYENNE	27,7
$\frac{\Sigma G}{\sqrt{N}}$	2,1

constaté ainsi que le trans-aconitate s'isomérisse spontanément en cis-aconitate dans les vieilles solutions. Nous avons cependant toujours utilisé des solutions de trans-aconitate préparées extemporanément et avons constaté que l'élimination urinaire d'aconitate est pratiquement identique à la quantité injectée.

On peut donc écarter cette hypothèse et attribuer l'augmentation de la citraturie à une inhibition de la dégradation du citrate au niveau de l'aconitase.

En injectant simultanément du trans-aconitate (100 μ Moles/100 g. de poids), du pyruvate et du dl-malate (200 μ Moles/100 g. de poids), on constate, comme lors de l'injection isolée de trans-aconitate que la quasi-totalité de l'aconitate se retrouve dans les urines. L'élimination urinaire de cet acide est, en effet, de 259.2 ± 57.9 μ Moles/24 h (tableau 20).

Quant aux acides citrique, α -cétoglutarique, succinique et malique, leur élimination n'est pas significativement différente de celle notée après injection de pyruvate + dl-malate sans trans-aconitate. Les valeurs trouvées pour ces quatre acides sont, en effet, respectivement de 77.6 ± 13.7 ; 43.0 ± 11.3 ; 38.6 ± 9.1 et 145.5 ± 40.4 après injection de

- 90 -
TABLEAU 20

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES CITRIQUE, ACONITIQUE & α -CETO-
GLUTARIQUE AU COURS DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRA-
PERITONEALE SIMULTANEE DE PYRUVATE (200 μ MOLES/100 G. de POIDS),
DE DL-MALATE (200 μ MOLES/100 G.) ET DE TRANS-ACONITATE DE
SODIUM (100 μ MOLES/100 g.)

(Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide aconitique</u>	<u>Acide α-ceto- glutarique</u>
1	88	335	42
2	59	133	21
3	106	365	66
4	47	184	35
5	86	250	43
6	78	242	36
7	65	215	34
8	92	350	67
	-----	-----	-----
MOYENNE	77,6	259,2	43,0
<u>2 5</u>	13,7	58,9	11,3
$\sqrt{N}$			

- 91 -
TABLÉAU 21.

ELIMINATION URINAIRE DES ACIDES SUCCINIQUE & MALIQUE AU COURS
DES 24 HEURES SUIVANT L'INJECTION INTRAPERITONEALE SIMULTANEE
DE PYRUVATE (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS), DE DL-MALATE (200 μ MOLES
/100 G.) ET DE TRANS-ACONITATE DE SODIUM (100 μ MOLES/100 G.)

Résultats exprimés en μ Moles/24 h.)

<u>Rat no.</u>	<u>Acide succinique</u>	<u>Acide malique</u>
1	40	197
2	18	71
3	58	258
4	22	160
5	29	235
6	30	166
7	36	183
8	44	214
	-----	-----
MOYENNE	34,6	185,5
<u>25</u>	9,1	40,4
√ N		

pyruvate + dl-malate + trans-aconitate, de $79,3 \pm 13,6$; $38,6 \pm 5,5$; $36,0 \pm 7,1$ et $173,1 \pm 24,0$ après injection de pyruvate + dl-malate sans trans-aconitate.

En présence de pyruvate + dl-malate, le trans-aconitate est donc éliminé par voie urinaire, sans que sa présence ne modifie en rien l'élimination des autres acides du cycle tricarboxylique.

Cette constatation est à rapprocher des résultats in vitro de Saffran et Prado (1949), selon lesquels l'inhibition de l'aconitase par le trans-aconitate disparaît en présence d'un excès de citrate.

Nos résultats indiquent que le trans-aconitate détermine de même in vivo une inhibition de l'aconitase traduite par une accumulation de citrate lorsqu'il est injecté seul, mais que cette action inhibitrice ne se manifeste pas lorsque le trans-aconitate est administré en même temps que des substrats (pyruvate + malate) qui conduisent à la formation d'une forte quantité de citrate. Il n'est ainsi pas possible de différencier à l'aide du trans-aconitate la fraction du malate métabolisée par le cycle citrique de celle formant de l' α -cétoglutarate sans passer par ce cycle.

II.

ETUDES PORTANT SUR LES ACIDES DU CYCLE CITRIQUE DANS LES TISSUS.

Ayant ainsi envisagé les voies métaboliques conduisant à l'augmentation de l'élimination urinaire des acides du cycle citrique à la suite de l'administration des acides dicarboxyliques, nous avons abordé le problème du lieu de formation de ces acides.

Nous avons déterminé dans ce but les modifications de concentration des acides citrique, succinique, fumarique et malique déterminées par l'injection de succinate et de malate dans le foie et le rein, organes dont le rôle apparaît primordial d'après les données des expériences in vitro. Nous n'avons pas dosé l'acide α -cétoglutarique en raison des modifications autolytiques extrêmement rapides de la concentration de cet acide dans les homogénats tissulaires (Le Page, 1950).

Les enzymes participant au cycle tricarboxylique étant abondants dans le cerveau, il eût été intéressant d'étudier également les modifications intracérébrales. Nous y avons cependant renoncé, car la concentration intracérébrale des acides du cycle citrique se modifie très rapidement sous l'influence de facteurs traumatiques inévitables lors de l'extirpation du cerveau (Frohman, Orten et Smith, 1951 b).

1) CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE ET INTRARENALE DES ACIDES
DU CYCLE CITRIQUE CHEZ LES RATS TEMOINS.

Nous avons étudié tout d'abord les concentrations des acides citrique, succinique, fumarique et malique dans les homogénats hépatiques et rénaux en l'absence de toute injection de substrat. Les résultats sont indiqués dans les tableaux 22 et 23 pour le foie, 24 et 25 pour le rein (pour faciliter la comparaison avec les chiffres de la littérature, qui sont presque toujours indiqués en $\mu\text{g./g.}$ de tissu frais, nous avons adopté cette même unité).

La concentration de citrate dans les homogénats hépatiques est de $13,0 \pm 2,9 \mu\text{g./g.}$ de foie frais. Ce chiffre est supérieur à celui de Buffe et Peters (1949) (valeurs extrêmes 0 et $3 \mu\text{g./g.}$), mais inférieur à ceux d'Orten et Smith (1939) ($16-26 \mu\text{g./g.}$), de Potter et Busch (1950) (moyenne : $47 \mu\text{g./g.}$, valeurs extrêmes : 20 et 36), de Frohman, Orten et Smith (1951 a) ($23 \pm 1 \mu\text{g./g.}$). L'état nutritionnel des rats joue certainement un rôle prépondérant dans ces discordances; rappelons que nos résultats concernent tous des rats alimentés avec le régime semi-synthétique décrit plus haut et non soumis à un jeûne avant d'être sacrifiés.

Les chromatogrammes des acides organiques

- 95 -
TABLEAU 22.

CONCENTRATION EN ACIDES CITRIQUE & SUCCINIQUE DES HOMOGENATS
HEPATIQUES EN L'ABSENCE DE TOUTE CHARGE.

(Résultats en µg/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide succinique</u>
1	13	29
2	11	27
3	16	51
4	7	17
5	14	32
6	8	26
7	19	46
8	16	22
9	-	36
10	-	47
	-----	-----
MOYENNE	13,0	33,3
$\frac{2,6}{\sqrt{N}}$	2,9	7,2

- 96 -
TABLEAU 23.

CONCENTRATION EN ACIDES FUMARIQUE & MALIQUE DES HOMOGENATS
HEPATIQUES EN L'ABSENCE DE TOUTE CHARGE.

(Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.}$ de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide fumarique</u>	<u>Acide malique</u>
1	18	22
2	15	27
3	26	63
4	17	29
5	19	57
6	11	40
7	13	54
8	12	44
9	10	50
10	24	62
	-----	-----
MOYENNE	16,5	44,8
$\frac{2}{\sqrt{N}}$	3,4	9,4

correspondant à 5 g. de foie comportent lors de la révélation par le vert de bromocrésol 5 spots. que nous avons identifiés aux acides suivants : succinique, fumarique, malique, lactique et pyrrolidonecarboxylique. L'acide aconitique n'apparaît pas avec cette révélation, mais une légère teinte rose correspondant à son spot est visible après révélation par le p-diméthylamino-benzaldéhyde dans l'anhydride acétique, qui met également en évidence des traces d'acide hippurique sous forme d'un spot orange dû, comme l'ont montré Gaffney, Schreier, Di Ferrante et Altman (1954), à l'oxlactone de cet acide.

La concentration de l'acide succinique dans ces homogénats hépatiques est de $33,3 \pm 7,2 \mu\text{g./g.}$, celle de l'acide fumarique $16,5 \pm 3,4$ et celle de l'acide malique $44,8 \pm 9,4$.

Les seules données que nous ayons trouvées dans la littérature concernant le dosage intrahépatique de ces acides ont été obtenues par la technique de chromatographie sur gel de silice de Frohman, Orten et Smith.

Selon ces auteurs (Frohman, Orten et Smith, 1951 a), la concentration de succinate est de $18,0 \pm 2 \mu\text{g./g.}$ chiffre qui est sensiblement inférieur au nôtre. La concentration

du fumarate de nos ~~homogénats~~ (16,5 ± 3,4 µg./g. de tissu frais) diffère notablement des premiers chiffres de Marshall, Orten et Smith (1949) (78 µg./g.) et de Frohman, Orten et Smith (1951 a) (25 ± 2 µg./g.). Elle est très voisine, par contre, des valeurs trouvées ultérieurement (Frohman et Orten, 1953) par ces mêmes auteurs, qui n'ont pu expliquer la divergence entre les résultats de leurs diverses séries de dosages. La concentration d'acide malique est de 3,6 ± 0,8 µg./g. selon Marshall, Friedberg et Da Costa (1951), de 15 ± 1 µg./g. selon Frohman, Orten et Smith (1951 a) et de 17 µg./g. selon Frohman et Orten (1953). Nous avons trouvé un chiffre plus élevé que ces divers auteurs, la concentration de l'acide malique (44,5 ± 9,4 µg./g.) s'avérant toujours supérieure à celle des acides succinique et fumarique.

La concentration de citrate de nos homogénats de rein est de 20,2 ± 5,4 µg./g. De même que pour les homogénats hépatiques, les chiffres de la littérature sont très divergents : 61 - 63 µg./g. (Orten et Smith, 1939), 14 µg./g. (Buffa et Peters, 1949), 56 µg./g. (valeurs extrêmes : 16 et 23) (Potter et Busch, 1950), 24 ± 1 µg./g. (Frohman, Orten et Smith, 1951 a), 56 µg./g. (Potter, Busch et Bothwell, 1951), 27 µg./g.

- 99 -
TABLEAU 24.

CONCENTRATION INTRARENALE DES ACIDES CITRIQUE & SUCCINIQUE

EN L'ABSENCE DE TOUTE INJECTION DE SUBSTRAT.

(Résultats exprimés en $\mu\text{g/g}$. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide succinique</u>
1	15	28
2	17	30
3	21	31
4	16	15
5	33	37
6	19	29
7	-	43
8	-	15
	-----	-----
MOYENNE	20,2	28,5
$\frac{2,6}{\sqrt{N}}$	5,4	6,8

- 100 -
TABLEAU 25.

CONCENTRATION INTRARENAL DES ACIDES FUMARIQUE & MALIQUE

EN L'ABSENCE DE TOUTE INJECTION DE SUBSTRAT.

(Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.}$ de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide fumarique</u>	<u>Acide malique</u>
1	13	31
2	17	46
3	21	51
4	11	32
5	23	52
6	15	37
7	40	80
8	9	28
	-----	-----
MOYENNE	18,6	44,7
$\frac{\Sigma}{\sqrt{N}}$	7,0	12,0

(Gitter, 1956).

Les chromatogrammes des acides organiques sont peu différents qualitativement de ceux des homogénats hépatiques. Selon les rares données de la littérature, il devait en être de même quantitativement, puisque, selon Frohman, Orten et Smith (1951 a), les concentrations suivantes ont été trouvées respectivement dans le foie et dans le rein : acide succinique, 18 et 17 ; acide fumarique, 85 et 71 ; acide malique, 15 et 11 $\mu\text{g./g.}$, l'acide aconitique étant inférieur à 1 $\mu\text{g./g.}$ dans les deux tissus. Signalons cependant que des différences beaucoup plus importantes ont été rapportées pour l'acide malique par Marshall, Friedberg et Da Costa (1951), soit 3,6 $\mu\text{g./g.}$ pour le foie et 18,8 pour le rein.

Nos propres résultats, comme ceux de Frohman, Orten et Smith, montrent des concentrations du même ordre de grandeur dans le rein et le foie, soit respectivement $28,5 \pm 6,8$ et $33,3 \pm 7,2$ pour l'acide succinique; $18,6 \pm 7,0$ et $16,5 \pm 3,4$ pour l'acide fumarique; $44,7 \pm 12,0$ et $44,8 \pm 9,4$ pour l'acide malique. De même que dans le cas du foie, la concentration intrarénale de l'acide malique dépasse celle des acides succinique et fumarique.

2) CHARGES EN ACIDES DICARBOXYLIQUES.

Pour étudier les modifications intratissulaires des acides du cycle citrique après injection d'acides dicarboxyliques, il importait de définir le moment où ces modifications apparaissent avec le plus de netteté.

Nous avons réalisé dans ce but des chromatographies des acides organiques hépatiques respectivement 10, 20, 30, 45, 60 et 90 minutes après administration de ces substrats et avons constaté ainsi que ces modifications étaient maxima pour les chromatogrammes des rats sacrifiés 45 minutes après l'injection.

45 minutes après l'administration de succinate, la concentration intrahépatique de succinate est significativement plus élevée que celle des animaux témoins ($45,6 \pm 5,6$ au lieu de $33,3 \pm 7,2$).

Les concentrations intrahépatiques de citrate ($11,7 \pm 2,6$ au lieu de $13,0 \pm 2,9$), de fumarate ($17,0 \pm 3,7$ au lieu de $16,5 \pm 3,4$) et de malate ($54,2 \pm 8,0$ au lieu de $44,7 \pm 9,4$) (tableaux 26 et 27) ne sont, par contre, pas modifiées de façon significative (au risque de 5 %).

- 103 -
TABLEAU 26.

CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE DES ACIDES CITRIQUE & SUCCINIQUE
45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE SUCCINATE DE
SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide succinique</u>
1	11	42
2	8	47
3	19	66
4	9	37
5	8	42
6	6	39
7	17	47
8	11	31
9	6	43
10	17	61
11	13	49
12	16	43
	-----	-----
MOYENNE	11,7	45,6
205 $\sqrt{N}$	2,6	5,6

- 104 -
TABLEAU 27.

CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE DES ACIDES FUMARIQUE & MALIQUE
45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE SUCCINATE DE
SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pobl de rats no.</u>	<u>Acide fumarique</u>	<u>Acide malique</u>
1	17	44
2	14	58
3	27	64
4	19	35
5	11	45
6	13	40
7	24	66
8	13	38
9	10	49
10	24	77
11	11	68
12	22	66
	-----	-----
MOYENNE	17,0	54,2
$\frac{206}{\sqrt{N}}$	3,7	8,0

- 105 -
TABLEAU 28.

CONCENTRATION INTRARENALE DES ACIDES CITRIQUE & SUCCINIQUE
45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE SUCCINATE
DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide succinique</u>
1	46	70
2	68	86
3	43	56
4	29	50
5	17	38
6	52	81
7	-	53
8	-	55
	-----	-----
MOYENNE	42,5	61,1
$\frac{2}{\sqrt{N}}$ $\frac{6}{-}$	14,4	11,6

TABLEAU 29.

CONCENTRATION INTRARENALE DES ACIDES FUMARIQUE & MALIQUE
45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE SUCCINATE
DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide fumarique</u>	<u>Acide malique</u>
1	31	73
2	46	120
3	33	83
4	26	61
5	23	37
6	35	80
7	21	35
8	25	70
	-----	-----
MOYENNE	30,0	69,9
$\frac{25}{\sqrt{N}}$	5,7	19,3

Les résultats sont bien différents pour les homogénats de rein. Non seulement la concentration de succinate y est supérieure à celle des témoins ($61,1 \pm 11,6 \mu\text{g./g.}$ au lieu de $26,5 \pm 6,8$), mais aussi les concentrations de citrate ($32,5 \pm 14,4$ au lieu de $20,2 \pm 5,4$), de fumarate ($30,0 \pm 5,7$ au lieu de $18,6 \pm 7,0$) et de malate ($69,9 \pm 19,3$ au lieu de $44,7 \pm 12,0$).

Après administration de dl-malate, on retrouve dans le foie des résultats superposables à ceux notés après injection de succinate, c'est-à-dire que seul l'acide injecté s'y trouve augmenté.

Les concentrations de citrate succinate, fumarate et malate sont respectivement de $12,4 \pm 2,6$; $31,7 \pm 3,2$; $18,2 \pm 5,2$ et $44,1 \pm 17,9 \mu\text{g./g.}$ (tableaux 30 et 31) après injection de dl-malate au lieu de $13,0 \pm 2,9$; $33,3 \pm 7,2$; $16,5 \pm 3,4$ et $44,8 \pm 9,4 \mu\text{g./g.}$ pour les témoins. Seule la concentration de malate est modifiée de façon significative au risque de 5 %.

Au niveau du rein (tableau 32), les résultats se rapprochent également de ceux concernant les injections

TABLEAU 30.

CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE DES ACIDES CITRIQUE & SUCCINIQUE

45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE DL-MALATE

DE SODIUM (200 μ MOLES/100 G. DE POIDS)

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide citrique</u>	<u>Acide succinique</u>
1	12	29
2	14	21
3	21	41
4	12	36
5	11	22
6	13	47
7	6	20
8	10	38
	-----	-----
MOYENNE	12,4	31,7
<u>26</u>	2,8	3,2
V N		

- 109 -
TABLEAU 31.

CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE DES ACIDES FUMARIQUE & MALIQUE

45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE DL-MALATE

DE SODIUM (200 μ /MOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

<u>Pool de rats no.</u>	<u>Acide fumarique</u>	<u>Acide malique</u>
1	13	62
2	23	82
3	31	128
4	10	65
5	13	77
6	24	102
7	12	54
8	20	103
	-----	-----
MOYENNE	18,2	84,1
$\frac{2 \cdot 6}{\sqrt{N}}$	5,2	17,9

- 110 -
TABLEAU 32.

CONCENTRATION INTRARENALE DES ACIDES SUCCINIQUE, FUMARIQUE
& MALIQUE 45 MINUTES APRES L'INJECTION INTRAPERITONEALE DE
DL-MALATE DE SODIUM (200 µMOL/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en µg/g. de tissu frais)

Pool de rats no.	Acide succinique	Acide fumarique	Acide malique
-----	-----	-----	-----
1	48	36	285
2	26	17	175
3	30	21	236
4	39	18	157
5	47	31	280
6	39	29	260
7	43	18	194
8	49	34	322
	-----	-----	-----
MOYENNE	40,1	25,5	238,6
$\frac{26}{\sqrt{N}}$	5,9	5,5	41,5

de succinate. Non seulement l'acide malique, mais aussi l'acide succinique sont augmentés de façon significative (respectivement $238,6 \pm 41,5$ et $40,1 \pm 5,9$ $\mu\text{g./G.}$ après dl-malate au lieu de $44,7 \pm 12,0$ et $28,5 \pm 6,8$ pour les témoins). La concentration de fumarate semble supérieure à celle des témoins ($25,5 \pm 5,5$ au lieu de $18,6 \pm 7,0$), mais cette différence n'est significative qu'au risque de 20 %. Nous ne disposons pas d'un nombre de dosages suffisant concernant le citrate après administration de dl-malate pour pouvoir en tirer des conclusions significatives.

Aussi bien après injection de succinate que de dl-malate, on constate donc une augmentation de la concentration intrarénale de tous les acides du cycle citrique dosés, tandis qu'au niveau du foie seule la concentration de l'acide injecté se trouve accrue.

3 - DISCUSSION

Les résultats que nous venons d'envisager montrent que l'administration d'acides dicarboxyliques, qui a pour conséquence une augmentation considérable de l'élimination

- 112 -
TABLEAU 33.

CARACTERE SIGNIFICATIF (AU RISQUE DE 5%) DES MODIFICATIONS DE
CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE & INTRARENALE DES PRINCIPAUX
ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE CONSTATEES 45 MINUTES APRES
INJECTION INTRAPERITONEALE DE SUCCINATE DE SODIUM (200 μ MOLES/
100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en μ g/g. de tissu frais)

Acide	Témoin	Après injection de succinate	Caractère signifi- catif au risque de 5%
----	-----	-----	-----
<u>I) MODIFICATIONS INTRAHEPATIQUES:</u>			
CITRIQUE	13,0 $\pm$ 2,9	11,7 $\pm$ 2,6	-
SUCCINIQUE	33,3 $\pm$ 7,2	45,6 $\pm$ 5,6	+
FUMARIQUE	16,5 $\pm$ 3,4	17,0 $\pm$ 3,7	-
MALIQUE	44,8 $\pm$ 9,4	54,2 $\pm$ 8,0	-
<u>II) MODIFICATIONS INTRARENALES:</u>			
CITRIQUE	20,4 $\pm$ 5,4	42,5 $\pm$ 14,4	+
SUCCINIQUE	28,5 $\pm$ 6,8	61,1 $\pm$ 11,6	+
FUMARIQUE	18,6 $\pm$ 7,0	30,0 $\pm$ 5,7	+
MALIQUE	44,7 $\pm$ 12,0	69,9 $\pm$ 19,3	+

TABIEAU 34.

CARACTERE SIGNIFICATIF (AU RISQUE DE 5%) DES MODIFICATIONS
DE CONCENTRATION INTRAHEPATIQUE & INTRARENALE DES PRINCIPAUX
ACIDES DU CYCLE TRICARBOXYLIQUE CONSTATEES 45 MINUTES APRES
INJECTION INTRAPERITONEALE DE DL-MALATE DE SODIUM
(200 µMOLES/100 G. DE POIDS).

(Résultats exprimés en µg/g. de tissu frais)

Acide	Témoin	Après injection de dl-malate	Caractère significatif au risque de 5%
----	----	-----	-----
<u>I) MODIFICATIONS INTRAHEPATIQUES:</u>			
CITRIQUE	13,0 ± 2,9	12,4 ± 2,8	-
SUCCINIQUE	33,3 ± 7,2	31,7 ± 3,2	-
FUMARIQUE	16,5 ± 3,4	18,2 ± 5,2	-
MALIQUE	44,8 ± 9,4	84,1 ± 17,9	+
<u>II) MODIFICATIONS INTRARENALES.</u>			
SUCCINIQUE	28,5 ± 6,8	40,1 ± 5,9	+
FUMARIQUE	18,6 ± 7,0	25,5 ± 5,5	-
MALIQUE	44,7 ± 12,0	238,6 ± 41,5	+

urinaire des acides du cycle citrique, détermine parallèlement un accroissement évident de la concentration intrarénale de ces acides, sans modification simultanée de leur concentration intrahépatique.

Ces constatations assignent un rôle primordial au rein dans la formation des acides urinaires;

Orten et Smith (1939) étudiant le problème du lieu de formation du citrate urinaire après injection de malate chez le rat, avaient déjà abouti à des conclusions analogues. Ces auteurs ont, en effet, dosé le citrate sanguin, urinaire et tissulaire après injection de malate et comparé les résultats avec ceux d'une série d'animaux témoins. Ils ont constaté ainsi l'absence de différence significative entre les deux groupes d'animaux en ce qui concerne le citrate sanguin, hépatique et musculaire. Les reins des rats ayant reçu du malate contenaient, par contre, nettement plus de citrate que les témoins. Ces mêmes auteurs (Smith et Orten, 1938) ont noté également que la concentration du citrate sanguin s'élève à peine après administration de succinate ou de fumarate, bien que des quantités importantes de citrate soient éliminées au même moment dans l'urine.

Le rein semble donc jouer un rôle essentiel non seulement pour la formation des acides du cycle citrique éliminés dans l'urine, mais plus généralement dans le déroulement de ce cycle in vivo.

C'est ainsi que Forssman (1941), étudiant les différences de concentration en succinate entre le sang artériel et le sang veineux du foie, du muscle et du rein au cours de perfusions de succinate chez le lapin, ne trouve qu'une différence artério-veineuse très faible pour le foie et le muscle, alors que cette différence est considérable pour le rein.

Il en conclut que le succinate administré n'est pas métabolisé activement dans le foie et le muscle, mais essentiellement dans le rein. L'élimination urinaire ne représentant dans ses expériences que 5 % de la quantité administrée ne jouerait qu'un rôle accessoire par rapport à l'oxydation intrarénale du succinate.

Notons à ce propos que le mécanisme de l'élimination urinaire des acides du cycle citrique est très mal connu. Après le stade de filtration glomérulaire,

une partie de ces acides doit être réabsorbée ou excrétée au niveau du tubule et l'on peut supposer que le processus tubulaire impliqué est identique pour des corps de formule chimique voisine, comme les divers acides dicarboxyliques. Il n'en est cependant peut-être pas de même pour les acides tricarboxyliques, tels que l'acide citrique. L'étude des modalités de l'élimination rénale de ces acides du cycle citrique, que nous projetons d'entreprendre, permettra d'interpréter avec plus de certitude les modifications de concentration de ces acides dans l'urine.

Ayant ainsi mis l'accent sur le rôle du rein, il faut signaler, cependant que Sjöström (1937), en considérant les différences de concentration artérioveineuse en citrate, avait abouti à des conclusions opposées à celles de Forssman, impliquant le foie comme siège essentiel du cycle citrique *in vivo*.

Nos propres résultats n'excluent pas la participation du foie dans le déroulement de ce cycle. La constatation d'une augmentation isolée de la concentration intrahépatique de l'acide injecté peut ne témoigner que de l'accroissement de son taux sanguin, car la totalité du sang contenu dans le foie ne peut être éliminé par le lavage de cet organe effectué avant l'homogénéisation.

Il est possible, cependant, qu'elle s'accompagne en fait d'une augmentation de la concentration intrahépatique des autres acides du cycle citrique, mais que cette augmentation soit trop discrète pour être décelable. Les réactions de ce cycle se dérouleraient alors dans le foie avec une vitesse supérieure à celle des réactions intrarénales, si bien que les métabolites intermédiaires ne s'accumuleraient pas de façon notable.

Une telle hypothèse n'expliquerait cependant pas l'influence considérable de la néphrectomie mise en évidence par Orten et Smith (1939) et par Forssman (1941). Ce dernier auteur a montré, en particulier, qu'après injection d'une même quantité de succinate, l'élévation du succinate sanguin est plus marquée et plus durable chez les lapins néphrectomisés que chez les animaux témoins.

Cette constatation s'inscrit encore en faveur du rôle prépondérant, sinon exclusif, du rein dans le métabolisme des acides dicarboxyliques de cycle citrique chez l'animal entier.

C O N C L U S I O N S
- - - - -

Malgré la somme des connaissances sur le cycle citrique acquises grâce à des expériences in vitro, on ne dispose que de rares données sur le déroulement physiologique de ce cycle chez l'animal entier, essentiellement en raison de difficultés techniques.

On peut se demander, en particulier, dans quelle mesure les acides dicarboxyliques sont métabolisés effectivement par l'intermédiaire de ce cycle, et non en empruntant une des voies "alternatives" décrites in vitro, notamment pour l'acide oxaloacétique.

Dans le but de contribuer à la solution de ce problème, nous avons étudié l'influence de l'administration

parentérale de quantités équimoléculaires des divers acides dicarboxyliques sur l'élimination urinaire des acides stables du cycle citrique chez le rat.

Le pourcentage de l'acide échappant au métabolisme et retrouvé dans l'urine varie fortement selon la nature de l'acide dicarboxylique injecté. Il est minimum pour le succinate, - témoignant de la réactivité particulière des enzymes ayant le succinate pour substrat-, maximum pour le dl-malate, -sans, cependant, qu'on retrouve dans l'urine une quantité de malate égale à la totalité de l'isomère d- non physiologique injecté.

La citraturie s'élève plus fortement après injection d' α -cétoglutarate qu'après administration des autres acides dicarboxyliques, constatation qui peut être attribuée soit à la formation directe du citrate à partir de l' α -cétoglutarate, soit au freinage du catabolisme du citrate sous l'influence de l'accumulation d' α -cétoglutarate.

La formation de l' α -cétoglutarate à partir des acides dicarboxyliques ne s'effectue que partiellement par l'intermédiaire du cycle citrique.

On constate, en effet, que l'élimination d' α -

cétoglutarate est plus faible lorsque l'on injecte du dl - malate au lieu de succinate ou de l-malate, bien que la citraturie ne soit pas réduite parallèlement. On peut en conclure qu'après injection de succinate ou de l-malate, qui déterminent la formation de quantités importantes d'oxalo - acétate, une partie de cet oxaloacétate ne se condense pas avec l'acétyl-coenzyme A en citrate, mais fournit directement de l' α -cétoglutarate, apparemment par transamination avec le glutamate.

Cette conclusion nous a conduits à rechercher si un manque d'acétyl-coenzyme A n'était pas responsable de ce métabolisme par une voie autre que le cycle citrique.

Nous avons vérifié cette hypothèse en injectant simultanément du pyruvate (source d'acétyl-coenzyme A) et un acide dicarboxylique (malate). Dans ces conditions, l'élimination de citrate est supérieure à la somme des citraturies trouvées après administration isolée de ces deux substrats.

Le fait d'associer les deux substrats ne modifie pas le pourcentage métabolisé, mais influence seulement sur

la voie métabolique empruntée, car l'élimination de malate et d' α -cétoglutarate ne diffère pas significativement après injection isolée ou associée de malate et de pyruvate.

Nous avons constaté de plus que, inversement, l'administration isolée de pyruvate s'accompagne d'une augmentation de l'élimination d' α -cétoglutarate, sans modification parallèle de la citraturie, le manque d'oxaloacétate conditionnant cette fois le métabolisme du pyruvate en dehors du cycle citrique.

Pour caractériser la fraction de l' α -cétoglutarate formée à partir de l'oxaloacétate par l'intermédiaire de ce cycle, nous avons tenté de bloquer le cycle citrique au niveau de l'aconitase. Nous avons eu recours, dans ce but, au trans-aconitate, qui s'est avéré dépourvu de toxicité aux doses utilisées et dont l'injection isolée accroît la citraturie. Nous avons constaté, cependant, que le trans-aconitate n'exerce pas d'action inhibitrice sur l'aconitase in vivo lorsqu'on l'associe au malate et au pyruvate, vraisemblablement en raison du caractère compétitif de cette inhibition.

Afin de préciser le rôle respectif des mécanis-

mes d'élimination et du métabolisme proprement dit, nous avons recherché le lieu de formation de ces acides urinaires.

Les conclusions des travaux réalisés jusqu'ici in vivo pour déceler le siège du cycle citrique étaient contradictoires, les uns le situant essentiellement au niveau du foie, les autres au niveau du rein.

Nous avons étudié pour notre part les modifications intrahépatiques et intrarénales des principaux acides du cycle citrique déterminées par l'administration d'acides dicarboxyliques.

Il apparaît ainsi que seul l'acide injecté s'accroît de façon significative dans le foie, tandis qu'au contraire la concentration de tous les acides dosés s'élève dans le tissu rénal, résultats qui indiquent le rôle prépondérant du rein.

- - - - -

- 124 -

BIBLIOGRAPHIE

- BARR C.G., Plant Physiol., 23, 443, 1948
- BISERTE G. et DASSONVILLE B., Clin.Chim.Acta, 1, 49, 1956
- BOOTHBY W.M. et ADAMS M., Am.J.Physiol., 107, 471, 1934
- BUFFA P. et PETERS R.A., J.Physiol., 110, 488, 1948
- BUFFA P., PETERS R.A. et WAKELIN R.W., Biochem.J., 48, 467, 1951
- BUSCH H., HURLBERT R.B. et POTTER van R., J.Biol.Chem., 196, 717, 1952
- BUSCH H. et POTTER van R., Cancer Res., 12, 660, 1952 (a)
- BUSCH H. et POTTER van R., J.Biol.Chem., 198, 71, 1952 (b)
- BUSCH H. et POTTER van R., Cancer Res., 13, 164, 1953
- BUSCH H., Cancer Res., 15, 365, 1955
- CAVALLINI D., FRONTALI N. et TOSCHI G., Nature, 163, 568, 1949 (a)
- CAVALLINI D., FRONTALI N. et TOSCHI G., Nature, 164, 792, 1949 (b)
- CAVALLINI D., TENTORI L. et MONDOVI B., Rend.Acad.Naz.Lincei (Sc.fis.nat.) 8, 70, 1950
- CAVALLINI D. et FRONTALI N., Ric.Sci., 23, 605, 1953
- CHEFTEL R.I., MUNIER R. et MACHEBOEUF M., Bull.Soc.Chim.Biol., 33, 840, 1951
- CHEFTEL R.I., MUNIER R. et MACHEBOEUF M., Ibid., 34, 380, 1952
- CHEFTEL R.I., MUNIER R. et MACHEBOEUF M., Ibid., 35, 1095, 1953
- CONSDEN R., GORDON A.H. et MARTIN A.J.P., Biochem.J., 38, 224, 1944
- DASSONVILLE B.N., Thèse Fac.Méd., Lille, 1955
- DEUEL H.R., MURRAY S. et HALLMAN L.F., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 37, 413, 1937
- DUPERON R., Rev.Gén.Bot., 63, 137, 1956
- DU RUISSEAU J.P., Thèse Fac.Sci., Paris, 1955
- EL HAWARY M.F.S. et THOMPSON R.H.S., Biochem.J., 53, 340, 1953
- EL HAWARY M.F.S. et THOMPSON R.H.S., Ibid., 58, 518, 1954
- ETTINGER R.P., GOLDBAUM L.R. et SMITH L.H., J.Biol.Chem., 199, 531, 1952

- FABIANI M.P. et EBERHARD R., Ann. Biol. Clin., 9, 60, 1951
- FORSSMAN S., Acta Physiol.scand.,2, Supp.5, 121 pp., 1941
- FRIEDEMANN T.E. et HAUGEN G.E., J. Biol.Chem.,147, 415, 1943
- FROHMAN C.E., ORTEN J.M. et SMITH A.H., J.Biol.Chem.,193, 277,
1951 (a)
- FROHMAN C.E., ORTEN J.M., et SMITH A.H.,Ibid.,193,803,1951 (b)
- FROHMAN C.E. et ORTEN J.M., J. Biol. Chem., 205, 717, 1953
- FURTH O. et HERRMANN H., Biochem. Z., 280, 448, 1935
- GAFFNEY G.W., SCHREIER K., DI FERRANTE N. et ALTMAN K.I.,
J. Biol. Chem.,206, 695, 1954
- GITTER S., Biochem. J., 63, 182, 1956
- GEY F., Zur quantitativen Bestimmung der Zitronensäure in Blut
und Urin mittelst Pentabromazonbildung.Thèse Doct.
Sci. Med., Bâle, H.Huber, Berne-Stuttgart, édit, 1952
- GEY F., Rev. Intern. Vitaminol., 25, 21, 1953
- GOODWIN T.W. et WILLIAMS G.R., Biochem. J., 51, 708, 1952
- GREVILLE G.D., Biochem. J., 33, 718, 1939
- HAPPOLD F.C. et TURNER J.M., Nature, 179, 155, 1957
- HERR E.B., SUMNER J.B. et YESAIR D.W., Arc.Biochem.Biophys.,
62, 29, 1956
- HUMMEL J.P., J. Biol. Chem., 180, 1225, 1949
- HUNTER G., Biochem. J., 62, 28 P, 1956
- ISHERWOOD F.A. et NIAVIS C.A., Biochem.J., 64, 549, 1956
- JERMSTAD A. et JENSEN K.B., Pharma.Acta Helv., 25, 209, 1950
- KATZ J. et CHAIKOFF I.L., J. Biol. Chem., 206, 887, 1954
- KATZ J. et CHAIKOFF I.L., Biochim.Biophys.Acta., 18, 87, 1955
- KOEPESELL H.J. et SHARPE E.S., Arch.Biochem.Biophys.,38,443.1952
- KOLTHOFF I.M. et LAITINEN H.A., pH and electrotitration, 1 vol.
190 pp.,J.Wiley,New-York,édit,1948

- KORANYI A. et SZENT-GYORGYI A., Dtsch.Med.Wschr., 63, 1029, 1938
- KREBS H.A., SALVIN E. et JOHNSON W.A., Biochem.J., 32, 113, 1938
- KREBS H.A. et EGGLESTON L.V., Ibid., 39, 408, 1955
- KREBS H.A., Endeavour, 16, 125, 1957
- KRUSIUS F.E., Acta physiol. scand., 2, Suppl.3, 162 pp., 1940
- KUN E. et GARCIO-HERNANDEZ M., Biochim.Biophys.Acta, 23, 181, 1957
- KUYPER A.C. et MATTILL H.A., J.Biol.Chem., 103, 51, 1933
- KVAMME E. et HELLMAN L., Anal. Chem., 26, 1995, 1954
- LAWRENCE R.D., Lancet, 233, 286, 1937
- LEE J.S. et LIFSON N., J. Biol. Chem., 193, 253, 1951
- LE PAGE G.A., Cancer Res., 10, 393, 1950
- LESTRADET H. et GUEST G.M., Ann. Biol. Clin., 9, 183, 1951
- LIEBECQ C. et PETERS R.A., Biochim.Biophys.Acta, 3, 215, 1949
- LINDENBAUM A., WHITE M.R. et SCHUBERT J., J.Biol.Chem., 190, 585, 1951
- LONG C., Biochem. J., 36, 447, 1944
- LUGG W.H. et OVERELL B.T., Nature, 160, 87, 1947
- LUGG W.H. et OVERELL B.T., Austr.J.Sc.Res., 1, 98, 1947
- Mc ARDLE B., Biochem. J., 60, 647, 1955
- MARKEES S., Experientia, 7, 314, 1951
- MARKEES S., Ibid., 11, 205, 1955
- MARSHALL L.M., ORTEN J.M. et SMITH A.H., J.Biol.Chem., 179, 112, 1949
- MARSHALL L.M. et DREW F.D., Fed. Proc., 9, 199, 1950
- MARSHALL L.M., FRIEDBERG F. et DA COSTA W.A., J.Biol.Chem., 188, 97, 1951
- MARTIUS C. Justus Liebigs Ann.Chem., 561, 227, 1949
- MARTIUS C. et NITZ-LITZOW D., Chem. Ber., 85, 605, 1952
- MEISTER A., SOBER H.A. et PETERSON E.A., Ibid., 206, 89, 1954
- MEYER C.E. et SMITH A.H., J.Biol.Chem., 134, 739, 1940
- MONDOVI B., ANTONINI E. et MODIANO G., Ric.Sci., 25, 2343, 1955

- ATELSON S., LUGOVOY J.K. et PINCUS J.B., J.Biol.Chem., 170, 597, 1947
- ATELSON S., PINCUS J.B. et LUGOVOY J.K., Ibid., 175, 745, 1948
- EKHOROCHEFF J. et WAJZER J. Bull.Soc.Chim.Biol., 35, 695, 1953
- ORDMANN J., DU RUISSEAU J.P. et NORDMANN R., Chromatographie quantitative sur papier des acides du cycle tri-carboxylique, Communic. au 3ème Congr.Intern. Biochim., Bruxelles 1955
- ORDMANN J., NORDMANN R., GAUCHERY O., MARTY A. et DU RUISSEAU J.P., Bull.Soc.Chim.Biol., 37, 325, 1955
- ORDMANN R., GAUCHERY O., DU RUISSEAU J.P., THOMAS Y. et NORDMANN J., Compt.Rend.Ac.Sc., 238, 2459, 1954 (a)
- ORDMANN R., GAUCHERY O., DU RUISSEAU J.P., THOMAS Y. et NORDMANN J., Bull.Soc.Chim.Biol., 36, 1461, 1954(b)
- ORDMANN R., GAUCHERY O., DU RUISSEAU J.P., THOMAS Y. et NORDMANN J., Ibid., 36, 1641, 1954 (c)
- ORDMANN R., DU RUISSEAU J.P. et NORDMANN J., Révélation différentielle de l'acide aconitique en chromatographie sur papier. Communic. au 3ème Congr.Intern. Biochim., Bruxelles, 1955.
- RTEN J.M. et SMITH A.H., J. Biol. Chem., 128, 101, 1939
- STEUX R. et LATURAZE J., Compt. Rend.Ac.Sc., 239, 512, 1954
- VERELL B.T., Austr. J. Sc. Res., 15, 28, 1952
- WEN J.A., IGGO B., SCANDRETT F.J. et STEWART C.P., Biochem. J., 58; 426, 1954
- OTTER van R. et BUSCH H. Cancer Res., 10, 353, 1950
- OTTER van R., Cancer Res., 11, 565, 1951
- OTTER van R. , BUSCH H. et BOTHWELL, J.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 76, 38, 1951
- POZZI-ESCOT M.E., Bull. Ass. Chim., 63, 363, 1946
- UCHER G.W., SHERMAN C.C et VICKERY H.B., J.Biol.Chem., 113, 235, 1936
- ACKER E., Biochim.Biophys.Acta, 4, 211, 1950

- SAFFRAN M. et DENSTEDT O.F., J. Biol. Chem., 175, 849, 1948
- SAFFRAN M. et PRADO J.L., Fed. Proc., 7, 182, 1948
- SAFFRAN M. et PRADO J.L., J. Biol. Chem. 180, 1301, 1949
- SAMUELSON O., Ion exchangers in analytical chemistry, 1 vol.,
Almqvist et Wiksell, édit, Stockholm, 1952
- SCHREIER K. et HACK W. Naturwiss, 43, 178, 1956
- SHERMAN C.C., MENDEL L.B. et SMITH A.H., J. Biol. Chem., 113,
247, 1936
- SJOSTROM P., Acta chir. scand., 79, Suppl.49, 1937
- SMITH A.H. et ORTEN J.M. Ibid., 124, 43, 1938
- STAHR L., Nord. Tidskr. Pharm., 2, 141, 1895
- STARK J.B., GOODBAN A.E. et OWENS H.S., Anal.Chem., 23, 413, 1951
- STERN J.R., in Methods in Enzymol., Academic Press, édit, New-York
3, 425, 1957
- TAKEDA Y. et HARA M., J. Biol. Chem., 214, 657, 1955
- TAUSKY H.H. et SHORR E., Ibid., 169, 103, 1947
- TAYLOR T.G., Biochem. J., 54, 48, 1953
- TAYLOR K.W. et SMITH M.J.H., Analyst, 80, 607, 1955
- TOWERS G.H.N. et MORTIMER D.C., Nature, 174, 1189, 1954
- VAS K., Acta chim. Acad. Sc. Hungaricae, 1, 335, 1951
- VINET A. et RAOUL Y., Bull. Soc. Chim. Biol., 24, 357, 1942
- WEIL-MALHERBE H. et BONE A.D., Biochem. J., 45, 377, 1949
- WEINHOUSE S., MILLINGTON R.H. et WENNER C.E., J. Am. Chem. Soc.,
72, 4332, 1950
- WEINHOUSE S., MILLINGTON R.H. et WENNER C.E., Cancer Res., 11,
845, 1951
- ZAPPI F., Ric. Sci., 24, 103, 1954

TABLE DES MATIERES

TECHNIQUES	p. 10
- A) Méthodes de dosage des acides du cycle tricarboxylique	p. 11
- Détermination des acides aconitique, succinique, fumarique et malique	p. 13
- Détermination de l'acide citrique	p. 30
- Détermination de l'acide α -cétoglutarique	p. 38
- B) Animaux	p. 47
- C) Interprétation statistique des résultats	p. 50
RESULTATS EXPERIMENTAUX	p. 51
- I. ETUDES PORTANT SUR LES ACIDES DU CYCLE CITRIQUE DE L'URINE	p. 52
- A) Elimination urinaire "basale" des acides du cycle citrique	p. 53
- B) Modifications de l'élimination urinaire des acides du cycle citrique déterminées par l'administration d'acides dicarboxyliques	p. 59
1) Charges en α -cétoglutarate	p. 61
2) Charges en succinate	p. 63
3) Charges en malate	p. 66
a) Charges en l-malate	p. 69
b) Charges en dl-malate	p. 69

4) Charges comportant l'administration de pyruvate	p. 77
a) Charges en pyruvate sans adminis- tration parallèle d'acides dicar- boxyliques	p. 77
b) Administration simultanée de pyru- vate et de malate	p. 79
5) Utilisation d'inhibiteurs du cycle ci- trique	p. 85
 - II. ETUDES PORTANT SUR LES ACIDES DU CYCLE CITRI- QUE DANS LES TISSUS	 p. 93
1) Concentration intrahépatique et intra- rénale des acides du cycle citrique chez les rats témoins	 p. 94
2) Charges en acides dicarboxyliques	p. 102
 - III. DISCUSSION	 p. 111
 CONCLUSIONS	 p. 118
BIBLIOGRAPHIE	p. 124

- - - - -

DEUXIEME THESE .

- - - - -

Propositions données par la Faculté.

" Le coenzyme A. Son rôle dans le métabolisme. "

Vu et approuvé :

Paris, le 8 mars 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J.PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

